

Vol. 25, No. 2.

March, 1937

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,

11 Itchome Kagacho, Ushigome.

Price: \$ 5.50 per volume.

Berichtigung

zur Arbeit: "Studien über das Histozyt". Von H. Akizuki.
Diese Zeitschr., **25**, 43.

Auf S. 57, Tabelle zur Darstellung des Tyrosinhistozyms muss
es heissen:

Benzoylasparagin	0.02	0,	statt	0.50	16,
Benzoyltyrosin	0.50	16,	statt	0.02	0.

STUDIES ON LIPASE.

III. Report. Effect of ovarian follicular hormone on the pancreatic lipase.

By

YOSHIO IWASAKI.

*(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,
Fukuoka. Director: Prof. Dr. K. Kodama.)*

(Received for publication, December 16, 1936)

As reported by R. Itoh in the foregoing series of this communication an unsaponifiable matter isolated from castor bean, seems to serve as lipase-activator, so that the author tested the effect of ovarian follicular hormone which seems to have some resemblance in the chemical constitution and nature on the synthetic, as well as hydrolytic action of pancreatic lipase.

It was found that the synthesis of fat from glycerol and oleic acid by pancreatic lipase is augmented by the presence of this hormone.

In this regard it is worth while to refer to the work of C. Kaufmann (1931). He reported a rise in blood fats of woman, when injected with an ovarian extract, but he ascribed this effect to some contaminating substance in his later report. Though an intimate relationship between fat metabolism and the sexual hormone has been widely recognised by all clinicians, yet there seems lacking still adequate explanations and evidence. The present communication seems to bring about an additional evience for the existence of the above relationship.

MATERIALS.

The enzyme preparation used in this study was the glycerol extract of hog pancreas prepared by the method of Willstätter and Waldtschmidt-Leitz (1923). The ovarian follicular hormone was the commercial "ovahormon" preparation (500 i.u.) manufactured by Teikokusha & Co., Ltd Kawasaki, Japan.

EXPERIMENTAL RESULTS.

A. Effect of ovarian follicular hormone on the hydrolytic reaction of pancreatic lipase.

The hydrolytic reaction was carried out in a conic flask of 50 cc. volume. The olive oil, enzyme preparation, ovarian follicular hormone and aqua dest were pipetted into this flask as shown in table I. The flask was stoppered, shaken two minutes vigorously and placed in a thermostat kept at 37°C for a definite reaction time. At the end of this reaction time, the contents were transferred into a conic flask by means of 30 cc. ethylalcohol and 15 cc. ether, and the liberated free acids were titrated with *N*/10 KOH-alcoholic solution using phenolphthalein as an indicator. Control tests were carried out in each case.

TABLE I.
Effect of ovarian follicular hormone on the hydrolytic
reaction of pancreatic lipase.

Olive oil in cc.	Lipase preparation in glycerol in cc.	Aqua dest. in cc.	Ovarian follicular hormone added in cc.	Degree of hydrolysis in %	
				in 60 minutes	in 120 minutes
1.5	0.3	10.7	0	15.96	25.73
1.5	0.3	10.45	0.25	8.76	11.21
1.5	0.3	10.2	0.5	5.96	7.71
1.5	0.3	9.95	0.75	5.17	7.03
1.5	0.3	9.7	1.0	5.10	6.97

As shown in the table the inhibiting effect is proportional to the quantities of ovarian follicular hormone.

B. Effect of ovarian follicular hormone on the synthetic reaction of pancreatic lipase.

The synthetic reaction was studied in the system containing oleic acid, glycerol, ovarian follicular hormone, aqua and enzyme preparation. They were shaken well at the beginning of the experiment as described above. The reaction temperature was 37°C and the reaction time was 17 and 24 hours. At the end of this

time the oleic acids which remained unsynthesized were titrated as described in the foregoing experiment. As shown in Table II the synthetic reaction of pancreatic lipase is accelerated by ovarian follicular hormone.

TABLE II.
Effect of ovarian follicular hormone on the synthetic reaction of pancreatic lipase.


Oleic acid in cc.	Lipase preparation in glycerol in cc.	Glycerol in cc.	Aqua dest. in cc.	Ovarian follicular hormone added in cc.	Degree of synthesis in %	
					in 17 hours	in 24 hours
0.5	1.0	9.0	1.0	0	25.0	27.94
0.5	1.0	9.0	0.75	0.25	29.0	31.81
0.5	1.0	9.0	0.5	0.5	31.19	33.25
0.5	1.0	9.0	0.25	0.75	32.31	34.56
0.5	1.0	9.0	0	1.0	32.88	34.81

From these experimental results it is evident that the ovarian follicular hormone, though not markedly but definitely accelerates the synthetic reaction and retards the hydrolytic reaction of pancreatic lipase.

The author is greatly indebted to Prof. Dr. K. Kodama and Dr. R. Itoh for their kind criticisms and suggestion throughout this research.

REFERENCES.

- Kaufmann, C. u. Mühlboeck, O. (1932): Archiv für Gynäkologie, **149**,
Willstätter, R. and Waldschmidt-Leitz, E. (1923): Z. f. physio-
621.
log. Chem., **125**, 132.



Digitized by the Internet Archive
in 2024

A COLORIMETRIC MICRODETERMINATION OF DESOXYCHOLIC AND CHOLIC ACID IN BILE.

By

YOSIMI ABE.

*(From the Biochemical Laboratory, Kyushu Imperial University,
Fukuoka, Japan. Director: Prof. K. Kodama.)*

(Received for publication, December 16, 1936)

Although the physiological importance of desoxycholic acid has been much elucidated, there seems to exist no good quantitative method of determining the acids. Quite recently Douglas-Sauermann (1935) reported a method based on the choleinic acid formation and Breusch (1934) another on the sublimation. But both methods require a large amount of material and moreover the procedures seem somewhat complicated and not practical. Therefore the author devised a colorimetric method, which can be applied to so small amount as 0.4 mg. of desoxycholic acid.

The principle lies in the fact that desoxycholic acid as well as cholic acid give a pink colour, when heated for a short time with vanillin and concentrated phosphoric acid (89%, spec. weight 1.750), while with diluted phosphoric acid (78%, spec. weight 1.625) only cholic acid comes out as positive. The colour nuance developed by both acids seems somewhat different. But this offers no hindrance for determination of the specific extinction of the colour by Pulfrich-stufenphotometer when we use K_V filter. The specific extinction of each acid runs completely parallel to the concentration. Moreover, the value given by the mixture of both acids can be expressed by the equation.

$$E_{\text{mix.}} = E_{\text{cholic}} + E_{\text{desoxycholic.}}$$

Since E_{cholic} can be determined independently, the desoxycholic value is easily calculated from

$$E_{\text{desoxycholic}} = E_{\text{mix.}} - E_{\text{cholic.}}$$

EXPERIMENTS.

I. Reagents.

1. Phosphoric Acid I. Pure phosphoric acid (Merck) is diluted with a small amount of water until its specific weight becomes 1.625 at 22°C. Its concentration is roughly 78% by weight.
2. Phosphoric Acid II. Pure phosphoric acid (Merck), specific weight should be 1.750 at 22°C. The concentration is nearly 89% by weight.
3. Vanillin-Alcohol Solution.
5 gm of pure vanillin is dissolved in 250 cc. of 96% alcohol.

II. Experiment with pure desoxycholic and cholic acid.

The sample of desoxycholic acid obtained from Takeda Drug Co. contains usually 6–12% cholic acid. It was purified by the method of Wieland and Sorge (1916). The material thus obtained showed the melting point 172°C (uncorr.) and the colour reaction of Gregory and Pascoe (1929) as well as Reinhold and Wright (1932) came out negative.

A definite amount of pure desoxycholic acid or cholic acid was weighted out and dissolved in pure alcohol. An aliquot portion of this solution was pipetted out into conic flask, alcohol was distilled off, and the residue was added to, with 0.2 cc. of vanillin-alcoholic solution. The alcohol was distilled off. Then 5 cc. of phosphoric acid was added. After being well mixed the flask was put in a water bath at a temperature 70°C for 8 minutes. The colour developed was measured by Pulfrich-stufenphotometer using K_v filter. The results are summarised in Table I–II and accompanying Fig. 1.

The similar experiments were repeated with cholic acid with dilute phosphoric acid (78%). The results are summarised in Table III. (Fig. 1)

Under this condition desoxycholic acid does not give any colour reaction. Therefore, when the mixture of cholic acid and desoxycholic acid was treated in the same manner, the colour intensity is

the same as cholic acid alone, as shown in Table IV.

TABLE I.
Desoxycholic acid.

Phosphoric acid II, (89%). Temp. 70°C.
Heating interval 8 minutes.

Desoxycholic acid mg	Reading of the drum	Specific extinction ($E_{II \text{ desoxycholic}}$)
1.0	25.4	0.595
0.8	33.5	0.475
0.6	43.8	0.359
0.4	57.8	0.238

TABLE II.
Cholic acid.

Phosphoric acid II, (89%). Temp. 70°C.
Heating interval 8 minutes.

Cholic acid mg.	Reading	Specific extinction ($E_{II \text{ cholic}}$)
1.0	17.3	0.762
0.8	24.5	0.611
0.6	34.8	0.458
0.4	49.5	0.305

TABLE III.
Cholic acid.

Phosphoric acid I, (78%). Temp. 50°C.
Heating interval 10 minutes.

Cholic acid mg	Reading	Specific extinction ($E_{I \text{ cholic}}$)
1.0	19.5	0.710
0.8	27.0	0.569
0.6	37.5	0.426
0.4	52.0	0.284

Fig. 1.

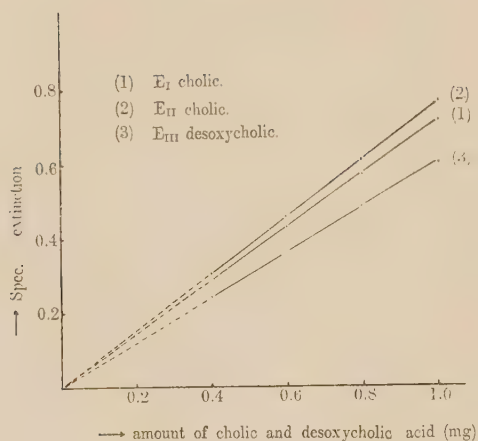


TABLE IV.

Cholic acid in presence of desoxycholic acid.

Phosphoric acid I, (78%). Temp. 50°C.

Heating interval 10 minutes.

Cholic acid mg	Desoxycholic acid mg	Reading	Spec. extinction
1.0	0.5	19.5	0.710
0.8	0.5	27.0	0.569
0.6	0.5	37.5	0.426
0.4	0.5	52.0	0.284

III. Determination of desoxycholic acid in presence of cholic acid.

As shown in the introduction the desoxycholic acid can be determined from the equation.

$$E_{II \text{ desoxycholic}} = E_{II \text{ mix.}} - E_{II \text{ cholic}} \quad (1)$$

In this case E_{II} means the specific extinction measured with phosphoric acid II. But $E_{II \text{ cholic}}$ can not be determined directly in the presence of desoxycholic acid, so that we are obliged to obtain this value by recalculation from $E_{I \text{ cholic}}$, namely from the value

obtained by phosphoric acid I. This can be done easily by multiplying the factor 1.07 to E_I . Therefore the equation (1) may be written as follows,

$$E_{II \text{ desoxycholic}} = E_{II \text{ mix.}} - E_{I \text{ cholic}} \times 1.07.$$

Or we can use Table VI which was constructed by interpolation of the observed values.

Table V shows the result of one of the typical experiments. In this experiment 0.5 mg cholic acid was exactly taken, mixed with a certain amount of desoxycholic acid as given in the table and $E_{I \text{ mix.}}$ and $E_{I \text{ cholic}}$ of this mixture were determined. From this observed value the amount of desoxycholic acid was calculated which is indicated in the sixth column. The maximal error is 3%, so that this method is fairly accurate.

TABLE V.

Cholic acid Desoxycholic acid	Reading	$E_{II \text{ mix.}}$	$E_{II \text{ choli.}}$	$E_{II \text{ desoxycholic}}$ ($E_{II \text{ mix.}} - E_{II \text{ choli.}}$)	Observed value of des- oxycholic acid mg	Error %
0.5 : 0.5	20.5	0.688	0.381	0.307	0.515	+3
0.5 : 0.4	24.0	0.620	0.381	0.239	0.401	+0.2
0.5 : 0.3	27.3	0.564	0.381	0.183	0.307	+2
0.5 : 0.2	31.4	0.503	0.381	0.122	0.204	+2
0.5 : 0.1	36.2	0.441	0.381	0.060	0.100	0

Determination of cholic and desoxycholic acid in bile.

An aliquot portion of bile was exactly taken into conic flask, diluted with 96% alcohol so as the solution taken for analysis contains 0.4–1.0 mg of bile acid, and alkalisied with a few drops of ammonia. To this mixture was added 10–20 mg of norite for the sake of decolourisation. If necessary the flask was warmed 70°C for 2 minutes, and after being cooled the solution was filtered. The residue was washed several times with a small portion of alcohol. The filtrate and the wash alcohol were brought together and the whole was made up to a definite volume with alcohol. From this

TABLE VI.

I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
58.0	0.239			0.398	38.4	0.416	0.585	0.545	0.700
57.5	0.240			0.403	38.2	0.418	0.588	0.548	0.702
57.0	0.244			0.410	38.0	0.420	0.591	0.551	0.705
56.5	0.248			0.416	37.8	0.423	0.595	0.554	0.711
56.0	0.252			0.423	37.6	0.425	0.598	0.557	0.714
55.5	0.256			0.430	37.4	0.427	0.601	0.560	0.717
55.0	0.260			0.436	37.2	0.430	0.605	0.564	0.722
54.5	0.264			0.443	37.0	0.432	0.608	0.566	0.725
54.0	0.268			0.450	36.8	0.434	0.611	0.569	0.729
53.5	0.272			0.457	36.6	0.437	0.615	0.573	0.734
53.0	0.276			0.463	36.4	0.439	0.618	0.575	0.737
52.5	0.280			0.470	36.2	0.441	0.621	0.578	0.741
52.0	0.284	0.400		0.477	36.0	0.444	0.625	0.582	0.746
51.5	0.288	0.405		0.484	35.8	0.446	0.628	0.585	0.749
51.0	0.292	0.411		0.490	35.6	0.449	0.632	0.589	0.754
50.5	0.297	0.418		0.500	35.4	0.451	0.635	0.591	0.757
50.0	0.301	0.423		0.505	35.2	0.454	0.639	0.595	0.763
49.5	0.305	0.429	0.400	0.512	35.0	0.456	0.642	0.598	0.766
49.0	0.310	0.436	0.406	0.521	34.8	0.458	0.645	0.600	0.769
48.5	0.314	0.442	0.412	0.527	34.6	0.461	0.649	0.604	0.774
48.0	0.319	0.449	0.418	0.536	34.4	0.463	0.652	0.607	0.778
47.5	0.323	0.454	0.423	0.542	34.2	0.466	0.656	0.611	0.783
47.0	0.328	0.461	0.430	0.551	34.0	0.469	0.660	0.615	0.787
46.5	0.333	0.468	0.437	0.559	33.8	0.471	0.663	0.618	0.791
46.0	0.337	0.474	0.442	0.566	33.6	0.474	0.667	0.621	0.796
45.5	0.342	0.481	0.448	0.574	33.4	0.477	0.671	0.625	0.801
45.0	0.347	0.488	0.455	0.583	33.2	0.480	0.675	0.629	0.806
44.5	0.352	0.495	0.460	0.591	33.0	0.482	0.678	0.632	0.810
44.0	0.357	0.502	0.468	0.600	32.8	0.484	0.681	0.635	0.813
43.5	0.362	0.509	0.475	0.608	32.6	0.487	0.685	0.639	0.818
43.0	0.367	0.516	0.480	0.616	32.4	0.490	0.690	0.643	0.823
42.5	0.372	0.523	0.488	0.625	32.2	0.492	0.692	0.644	0.826
42.0	0.377	0.530	0.494	0.633	32.0	0.495	0.697	0.649	0.831
41.5	0.382	0.538	0.501	0.642	31.8	0.498	0.701	0.653	0.836
41.0	0.387	0.545	0.507	0.650	31.6	0.500	0.704	0.656	0.840
40.5	0.393	0.553	0.515	0.660	31.4	0.503	0.708	0.660	0.845
40.0	0.398	0.560	0.522	0.668	31.2	0.506	0.712	0.664	0.850
39.8	0.400	0.563	0.524	0.672	31.0	0.509	0.716	0.667	0.854
39.6	0.402	0.566	0.527	0.675	30.8	0.511	0.719	0.670	0.858
39.4	0.405	0.570	0.531	0.680	30.6	0.514	0.723	0.674	0.863
39.2	0.407	0.573	0.534	0.683	30.4	0.517	0.728	0.678	0.868
39.0	0.409	0.576	0.536	0.687	30.2	0.520	0.732	0.682	0.873
38.8	0.411	0.578	0.539	0.690	30.0	0.523	0.736	0.686	0.878
38.6	0.413	0.581	0.541	0.694	29.8	0.526	0.740	0.690	0.884

- I Reading.
 II Specific Extinction.
 III Amount of cholic acid in mg., calculated from $E_{\text{I cholic}}$ (78% H_3PO_4).
 IV Amount of cholic acid in mg., calculated from $E_{\text{II cholic}}$ (89% H_3PO_4).
 V Amount of desoxycholic acid in mg., calculated from $E_{\text{II desoxycholic}}$ (89% H_3PO_4).

TABLE VI (continued)

I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
29.6	0.529	0.745	0.693	0.889	20.8	0.682	0.960	0.895	
29.4	0.532	0.749	0.693	0.894	20.6	0.686	0.966	0.900	
29.2	0.535	0.753	0.702	0.900	20.4	0.690	0.971	0.905	
29.0	0.538	0.757	0.705	0.904	20.2	0.695	0.978	0.911	
28.8	0.541	0.761	0.709	0.909	20.0	0.699	0.984	0.917	
28.6	0.544	0.766	0.713	0.914	19.9	0.701	0.987	0.919	
28.4	0.547	0.770	0.717	0.919	19.8	0.703	0.990	0.922	
28.2	0.550	0.774	0.721	0.924	19.7	0.706	0.994	0.926	
28.0	0.552	0.777	0.724	0.927	19.6	0.708	0.997	0.928	
27.8	0.556	0.783	0.729	0.934	19.5	0.710	1.000	0.931	
27.6	0.559	0.787	0.733	0.939	19.4	0.712		0.934	
27.4	0.562	0.791	0.737	0.944	19.3	0.714		0.937	
27.2	0.565	0.795	0.741	0.949	19.2	0.717		0.941	
27.0	0.569	0.800	0.746	0.956	19.1	0.719		0.943	
26.8	0.572	0.805	0.750	0.961	19.0	0.721		0.946	
26.6	0.575	0.809	0.754	0.966	18.9	0.724		0.949	
26.4	0.578	0.813	0.758	0.971	18.8	0.726		0.952	
26.2	0.582	0.819	0.763	0.978	18.7	0.728		0.955	
26.0	0.585	0.823	0.767	0.983	18.6	0.731		0.959	
25.8	0.588	0.828	0.771	0.988	18.5	0.733		0.961	
25.6	0.592	0.833	0.776	0.994	18.4	0.735		0.964	
25.4	0.595	0.838	0.780	1.000	18.3	0.738		0.968	
25.2	0.599	0.843	0.786		18.2	0.740		0.971	
25.0	0.602	0.847	0.790		18.1	0.742		0.973	
24.8	0.606	0.853	0.795		17.0	0.745		0.977	
24.6	0.609	0.857	0.799		17.9	0.747		0.980	
24.4	0.613	0.863	0.804		17.8	0.750		0.984	
24.2	0.616	0.867	0.808		17.7	0.752		0.986	
24.0	0.620	0.873	0.813		17.6	0.755		0.990	
23.8	0.623	0.877	0.817		17.5	0.757		0.993	
23.6	0.627	0.883	0.822		17.4	0.760		0.997	
23.4	0.631	0.888	0.827		17.3	0.762		1.000	
23.2	0.635	0.894	0.833		17.2	0.765			
23.0	0.638	0.898	0.837		17.1	0.767			
22.8	0.642	0.903	0.842		17.0	0.770			
22.6	0.646	0.909	0.847		16.9	0.772			
22.4	0.650	0.915	0.853		16.8	0.775			
22.2	0.654	0.921	0.858		16.7	0.777			
22.0	0.658	0.926	0.863		16.6	0.780			
21.8	0.662	0.932	0.868		16.5	0.783			
21.6	0.666	0.938	0.874		16.4	0.785			
21.4	0.670	0.943	0.879		16.3	0.788			
21.2	0.674	0.949	0.884		16.2	0.791			
21.0	0.678	0.953	0.889		16.1	0.793			

I Reading.

II Specific Extinction.

III Amount of cholic acid in mg., calculated from $E_{\text{I cholic}}$ (78% H_3PO_4).IV Amount of cholic acid in mg., calculated from $E_{\text{II cholic}}$ (89% H_3PO_4).V Amount of desoxycholic acid in mg., calculated from $E_{\text{II desoxycholic}}$ (89% H_3PO_4).

TABLE VI (continued)

I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
16.0	0.796				11.6	0.936			
15.9	0.799				11.5	0.939			
15.8	0.801				11.4	0.943			
15.7	0.804				11.3	0.947			
15.6	0.807				11.2	0.951			
15.5	0.810				11.1	0.955			
15.4	0.813				11.0	0.959			
15.3	0.815				10.9	0.963			
15.2	0.818				10.8	0.967			
15.1	0.821				10.7	0.971			
15.0	0.824				10.6	0.975			
14.9	0.827				10.5	0.979			
14.8	0.830				10.4	0.983			
14.7	0.833				10.3	0.987			
14.6	0.836				10.2	0.991			
14.5	0.839				10.1	0.996			
14.4	0.842				10.0	1.000			
14.3	0.845								
14.2	0.848								
14.1	0.851								
14.0	0.854								
13.9	0.857								
13.8	0.860								
13.7	0.863								
13.6	0.867								
13.5	0.870								
13.4	0.873								
13.3	0.876								
13.2	0.879								
13.1	0.883								
13.0	0.886								
12.9	0.889								
12.8	0.893								
12.7	0.896								
12.6	0.900								
12.5	0.903								
12.4	0.907								
12.3	0.910								
12.2	0.914								
12.1	0.917								
12.0	0.921								
11.9	0.925								
11.8	0.928								
11.7	0.932								

- I Reading.
 II Specific Extinction.
 III Amount of cholic acid in mg., calculated from $E_{\text{I cholic}}$ (78% H_3PO_4).
 IV Amount of cholic acid in mg., calculated from $E_{\text{II cholic}}$ (89% H_3PO_4).
 V Amount of desoxycholic acid in mg., calculated from $E_{\text{II desoxycholic}}$ (89% H_3PO_4).

solution an aliquot portion was taken out into conic flask, and alcohol was evaporated off gradually on the boiled water bath. To the residue, 0.2 cc. of vanillin-alcohol solution was added and again evaporated. In this case not even a trace of water should remain in the flask. To this completely dried residue, 5 cc. phosphoric acid II is added. The resultant solution is warmed at 50°C for 10 minutes. If cholic acid exists, a pink colour develops. When cooled, the specific extinction ($E_{I\text{cholic}}$) was determined with Pulfrich-stutenphotometer, using K_V filter. From this observed value $E_{II\text{cholic}}$ was calculated by multiplying 1.07 or directly from Table VI.

The similar process is repeated using phosphoric acid II and warming 8 minutes at 70°C. In this way $E_{II\text{mix}}$ is measured. $E_{II\text{mix}}$ and $E_{II\text{cholic}}$ give $E_{II\text{desoxycholic}}$. From this we can easily calculate the amount of desoxycholic acid from the Table VI.

As stated, above, the solution taken for analysis should contain 0.4–1.0 mg. because in this range the Lambert-Beer's law is strictly obeyed.

The dilution of bile necessary for this condition is different with animals. Roughly speaking the following dilution seems to be adequate.

	Dilution	Rough amount	
		cc. taken for cholic acid analysis	cc. taken for desoxycholic acid analysis
Rabbit	100	10	0.5
Bull	50	0.5	0.5
Dog	100	0.5	0.5
Man	100	0.5	0.5

Some example of analysis of bladder bile of man, rabbit and bull are given here.

1. Cholic and desoxycholic acid contents in rabbits and bulls bladder bile.

Example	Cholic acid g/dl	Desoxycholic acid g/dl
Rabbit 1	0.736	18.780
2	0.692	19.020
3	0.823	19.375
Bull 1	7.362	1.560
2	4.000	1.830
3	5.600	1.890

2. Cholic and desoxycholic acid contents of bladder bile of the patients suffering from bile duct diseases.

Patient and Diagnosis	Cholic acid g/dl	Desoxycholic acid g/dl
F. Cholecystitis cum concremento	0.454	1.050
M. „	0.523	0.956
I. „	0.202	2.025
K. „	0.103	0.603
T. „	0.312	0.430
N. Cholecystitis sine concremento	0.596	2.150
M. „	2.055	1.892
F. „ + Livercirrhosis	4.110	5.620
O. Pericholecystitis adhaesiva + stagnant gall-bladder	0.660	1.506
K. Cancer of Pancreas + stagnant gall-bladder	0.025	0.650

Table VII shows how the added desoxycholic acid to bile was recovered.

TABLE VII.

Desoxycholic acid added mg	Reading	$E_{II\text{mix.}}$	Increase of $E_{II\text{mix.}}$	Observed value of desoxycholic acid mg	Error %
0	17.0	0.770			
0.1	14.8	0.830	0.060	0.100	0
0.2	13.0	0.886	0.116	0.194	-3
0.3	11.3	0.947	0.177	0.297	-1

RESUME.

A new micro-method for quantitative determination of cholic and desoxycholic acid in bile is reported and some analytical examples are given.

The author is greatly indebted to Prof. K. Kodama and Prof. S. Akaiwa for their kind suggestion and criticism.

REFERENCES.

- Breusch, F. (1934): Z. Physiol. Chem., **227**, 242.
Douglas-Sauermann, A. G. (1934): Z. Physiol. Chem., **231**, 92.
Gregory, R. & Pascoe, T. A. (1929): Jl. Biol. Chem., **83**, 35.
Reinhold, J. G. & Wright, W. D. (1932): Jl. Biol. Chem., **96**, 637.
Wieland, H. & Sorge, H. (1916): Z. Physiol. Chem., **97**, 1.

ÜBER DIE PHOTOELEKTRISCHE BESTIMMUNG DER EXTINKTIONSKOEFFICIENTEN DER LÖSUNGEN.¹⁾

VON

AKIJI FUJITA UND TOSHIMASA SAKAMOTO.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Kitasato-Instituts, Tokio.)

(Eingegangen am 16. Dezember 1936)

In diesem Laboratorium hat Tomita (1935) einen lichtelektrischen Bestimmungsapparat des Photostroms konstruiert und ausführlich beschrieben. Zur Verstärkung des Photostroms in der Größenordnung von 10^{-10} bis 10^{-12} Ampere wurde das Brückensystem von Du Bridge (1931) angewandt und zur Vereinfachung der Manipulationen wurde es modifiziert und verbessert. Das Schaltungsschema desselben wird in Abb. 1 gezeigt. Bisher war die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten nur in sichtbarem Gebiet möglich. Durch weitere Versuche wurden die Lichtquellen, Filter und Stromregulator verbessert und auch die geeigneten Bedingungen zur Untersuchung des Ultraviolettgebietes festgestellt. Wir sind jetzt instande, die Extinktionskoeffizienten der gelösten Substanzen für beliebige Wellenlänge zwischen 190 und 730 $m\mu$ mit diesem Apparat genau zu bestimmen.

In dieser Arbeit wird die wichtige für die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten notwendige verbesserte Technik und die nötigen Vorsichtsmassregeln beschrieben und einige der mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse mitgeteilt.

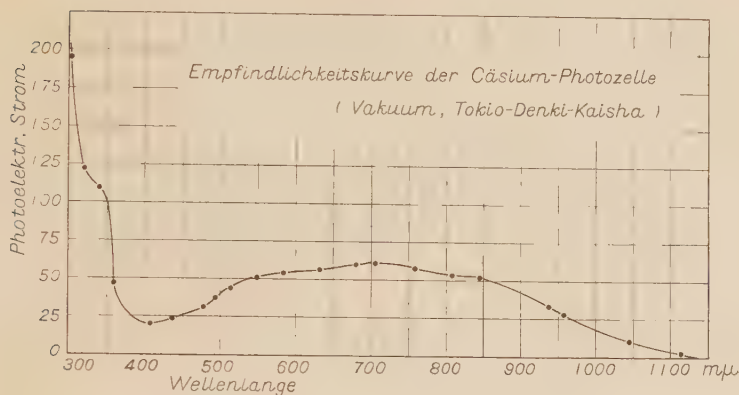
Messapparate.

A. VERSTÄRKERSYSTEM.

1. Photozellen.

¹⁾ Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Gesellschaft Nippon Gakujutsu Shinkokai (1935) ausgeführt, der wir unseren aufrichtigen Dank ausdrücken. Die Ergebnisse wurden am 22. September 1936 am Biochemischen Kongress zu Niigata mitgeteilt.

Abb. 2.



violettstrahlen (innerhalb 300 $m\mu$) empfindlich.

2. Vakuumröhre für Verstärkung.

Zur Verstärkung dienen Vierelektrodenröhren (UX-54¹⁾). Sie haben ungefähr dieselben Charakteristik wie FP-54 "Pliotron" von General Electric Company, Amerika.

3. Vakuumhochwiderstände für Steuergitter.²⁾

Zwei Hochwiderstände 10^9 und 10^{10} Ohm werden gebraucht. Der letztere wird nur zur Bestimmung der Wellenlänge unterhalb 300 $m\mu$ benutzt.

4. Potentiometer.

Kompensationsapparat³⁾ mit Gesamtwiderstand von 15 000 Ohm (0,1 bis 14 000 Ohm) wurde angewendet.

5. Galvanometer.

Zeigergalvanometer⁴⁾ mit der Empfindlichkeit von $7 \cdot 10^{-7}$ Ampere. Zur Messung der Lichtstrahlen unterhalb 300 $m\mu$ dient Spiegelgalvanometer mit der Empfindlichkeit von $2,5 \cdot 10^{-9}$ Ampere für 1 mm Ausschlag bei 1 m Skalenabstand.

1,2) Hersteller: Tokyo Denki Kaisha. 3) Hersteller: Otto Wolff, Berlin (Katalog-Nr. 657). 4) Hersteller: Yokogawa Denki Seisakujo-Tokio. (Katalog-Nr. D-2).

6. Widerstände.

Alle Widerstände, ausgenommen Vakuumhochwiderstände, sind Drahtwiderstände für Radioinstrumente.

7. Akkumulatoren.

In Abb. 1 veranschaulichte Akkumulatoren¹⁾ B₃, B₄ und B₅ müssen grosse Kapazität haben (60 bis 100 Amperestunden). Die Kapazität von B₁ und B₂ sind 10 bis 40 Amperestunden. B₆ 1 Amperestunde.

B. OPTISCHES SYSTEM.²⁾

1. Lichtquellen.

Da für unsere Zwecke nur die Lichtstrahlen von konstanter Intensität und kontinuierlichem Spektrum in Betracht kommen, sind Bogenlampe, Quecksilberdampfampe und Funkenstrecke unzuweckmässig. Die Metallfadenlampe für Kinematograph (100 V. 500 W. oder 75 V. 500 W.) hat sich am besten bewährt. Sie kann für die Bestimmung von beliebiger Wellenlänge, die langwelliger sind als 300 m μ , benutzt werden. Die Schwankungen der Lichtintensitäten infolge der Schwankungen der elektrischen Quelle können durch den automatischen Potentialregulator nach Tomita (1936) praktisch vollkommen beseitigt werden (innerhalb 0,1%).

Zur Messung der Lichtstrahlen kurzwelliger als 300 m μ dient Wasserstoff-Entladungsrohr³⁾ nach Bay-Steiner, in modifizierter Ausführung, mit eingeschmolzenen Nickelelektroden, angeschmolzenem Wasserstoffreservoir und mit, unter Verwendung von Zwischengläsern, aufgeschmolzenem Quarzfenster (4000 V, 500 bis 750 mA. Wechselstrom). Das Rohr wird aus Jena Duranglas hergestellt und ist mit einem Kühlmantel umgeben, mit Anschlüssen für den Kühlwasser-Zu- und Ablauf. Zum Betrieb desselben dient ein Transformator⁴⁾ (100/4000 V. 2KVA max.).

1) Hersteller: Shimazu Seisakujo. 2) Hersteller der optischen Bank: Noguechi Seisakujo, Tokio. 3) Hersteller: Hanff u. Buest, Berlin. 4) Hersteller: Seidensha, Tokio.

2. Monochromatoren.

Zur Messung der Lichtstrahlen im sichtbaren Bereich (über $400\text{ m}\mu$) dient ein Monochromator¹⁾ mit Youngscher Prismenanordnung (Dispersion von C bis $F=3^\circ$). Je nach dem zu messenden Bereich wird das Licht durch geeignete Filter abfiltriert.

Zur Messung der Ultraviolettstrahlen dient ein Quarzmonochromator,³⁾ wobei, wenn nötig, das sichtbare Licht durch geeignete Filter beseitigt wird.

3. Filter.

Das durch einfachen Monochromator (nicht durch Doppelmonochromator) passierte Licht ist nicht streng rein monochromatisch, sondern in kleinem Bruchteil sind mehr oder weniger andere Wellenlängen beigemischt. Da die von uns benutzte Cäsium-Photozelle für verschiedene Wellenlängen nicht gleichmässig, sondern je nach den Wellenlängen sehr verschieden empfindlich ist (vgl. Abb. 2), so kann die kleine Beimengung je nach den zu bestimmenden Spektralgebieten nicht unbedeutend die Resultate beeinflussen. Dazu haben wir eine Reihe von Filtern mit wirksamer Breite von ungefähr $100\text{ m}\mu$ hergestellt, die sich durch zahlreiche Messungen praktisch vollkommen bewährt haben. Die Filter von noch selektiverer Durchlässigkeit mit der Breite von ungefähr $30\text{ m}\mu$ (vgl. Fujita u. Tomita, 1935) lassen so wenig Licht durch, dass sie sich zu diesem Zwecke ungeeignet erwiesen.

Dazu dienen folgende Filter:

- (1) $300\text{ bis }390\text{ m}\mu$:
Schwarzglas ultraviolettdurchsichtig³⁾ ($0,22\text{ cm}$).
- (2) $390\text{ bis }475\text{ m}\mu$:
i) $m/5$ Kupfersulfat-Ammoniak-Lösung⁴⁾ ($1,0\text{ cm}$).
ii) $34\text{ g Cu(NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ wird in Wasser gelöst und auf 100 ccm aufgefüllt. ($1,7\text{ cm}$).
- (3) $470\text{ bis }520\text{ m}\mu$:

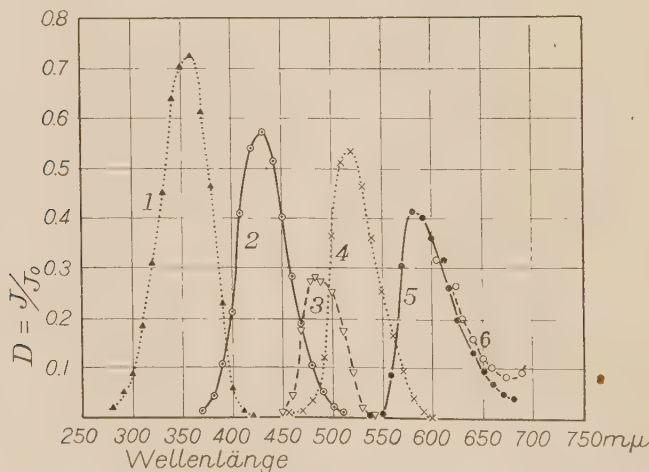
1) Hersteller: Carl Leiss, Berlin-Steglitz, (Katalog-Nr. 51/15). 2) Hersteller: Adam Hilger, London (Katalog-Nr. D-33). 3) Hersteller: Sendlinger Optische Werke, Berlin-Zehlendorf. 4) $5\text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ wird in Wasser gelöst, mit konzentriertem Ammoniak bis zur vollkommenen Lösung des Niederschlages versetzt und mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.

- i) 60 mg Guineagrün in 100 ccm Wasser (1,0 cm).
- ii) Cu-nitrat-Lösung wie 2 ii. (1,7 cm).
- (4) 480 bis 555 $m\mu$:
 - i) 20 mg Tartrazin in 100 ccm Wasser (1,0 cm).
 - ii) Cu-nitrat-Lösung wie 2 ii. (1,7 cm).
- (5) 560 bis 675 $m\mu$:
 - i) 20 mg Tartrazin und 20 mg Erythrosin in 100 ccm Wasser (1,0 cm).
 - ii) 2,82 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ wird in Wasser gelöst und auf 100 ccm aufgefüllt. (3,2 cm).
- (6) Langwelliger als 680 $m\mu$:¹⁾
 - Cu-Sulfat-Lösung wie 5 ii (3,2 cm) allein.

Die Durchlässigkeit d. h. J/J_0 der einzelnen Filtersysteme wird in Abb. 3 gezeigt. Filter 3 ist gewöhnlich entbehrlich.

Zur Messung der kurzwelligeren Ultraviolettstrahlen (innerhalb 300 $m\mu$) dient Cadmiumphotozelle. Da sie für Lichtstrahlen, die langwelliger sind als 300 $m\mu$, nicht empfindlich ist, so ist kein besonderer Filter dazu nötig.

Abb. 3.



4. Eichung der Monochromatoren.

Da der Monochromator im Handel gewöhnlich nicht geeicht ist,

¹⁾ Mit zunehmender Wellenlänge wird eine Küvette mit noch dünnerer Cu-Sulfat-Lösung und eine Küvette mit fließendem Wasser benutzt.

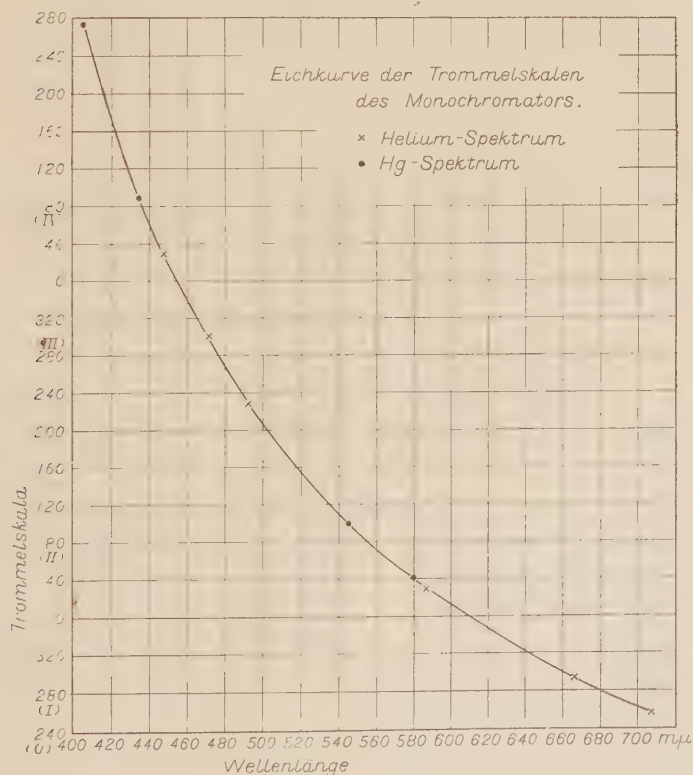
haben wir denselben folgendermassen geeicht. Dazu wählen wir 6 Linien des Helium-Geissleröhre¹⁾ und 4 Linien der Quecksilberdampfampe und zwar:

Heliumspektrum: 447,2, 471,3, 492,2, 587,6, 667,8, 706,5 $m\mu$.

Quecksilberspektrum: 404,6, 435,8, 546,1, 579,1 $m\mu$.

Von jeder Linie werden die entsprechenden Skalen der Trommel notiert und durch graphische Darstellung der Kurve (Trommelskalen/Wellenlänge) (vgl. Abb. 4) kann die Skala der Trommel entsprechend beliebiger Wellenlänge leicht abgelesen

Abb. 4.



¹⁾ Hersteller: Carl Zeiss. Zum Betrieb dient ein Transformator für Neon-Röhre (100/3000 V. Okuno electric Co. Tokio).

werden. In Tabelle I wird als Beispiel die Eich-tabelle der Trommel von unserem Apparat angeführt, die zur praktischen Bestimmung von Nutzen ist.

Zur Eichung des Quarzmonochromators dient das Natriumlicht ($589\text{ m}\mu$) sowie violette, blaue und grüne Linien der Quecksilberdampf-lampe, welche auf die entsprechenden Skalenteile der Messtrommel eingestellt werden. Dadurch werden die ganzen Skalenteile des Ultraviolettes gleichzeitig eingestellt.

Die aus dem Glasmonochromator austretenden Lichtstrahlen umfassen in unserer Anordnung¹⁾ die Breite von ungefähr 5 bis $10\text{ m}\mu$ bei 400 bis $500\text{ m}\mu$, 10 bis $15\text{ m}\mu$ bei 505 bis $560\text{ m}\mu$ und 20 bis $25\text{ m}\mu$ bei langwelligeren als $570\text{ m}\mu$. Beim Quarzmonochromator im Ultraviolettgebiet je nach der Weite des Spaltes 5 bis $30\text{ m}\mu$.

Ausführung.

1. Ein bestimmtes Potential wird zum Verstärkersystem gegeben.

2. Das in die Photozelle eintretende Licht wird ausgeschaltet. Das Potentiometer P wird auf 0 eingestellt und beobachtet, ob das Galvanometer auf 0 zeigt. Wenn das nicht der Fall ist, so bringt man es durch Drehung von R_2 und R_3 gerade auf 0.

3. Der zweite Kurbel des Potentiometers ($\times 100$) wird zu 1 oder 2 gedreht und das Licht wird durch Kontrollkürvette in die Photozelle eingelassen.

4. Durch Drehung der Kurbeln des Potentiometers wird der Zeiger des Galvanometers auf 0 gebracht und der eingeschaltete Widerstand wird abgelesen. (Es sei J_0). Der Eintrittsspalt wird dabei je nach dem Ausschlag zu geeigneter Weite variiert.

1) Die Weite des Eintrittsspalt des Monochromators war 0,2 bis $0,9\text{ mm}$ (Skala: 10 bis 50) bei sichtbaren und 0,27 bis $0,9\text{ mm}$ (Skala: 15 bis 50) bei langwelligeren ultravioletten und 0,9 bis 4 mm (Skala: 50 bis 240) bei kurzwelligeren ultravioletten Strahlen. Die des Austrittsspalt war $0,38\text{ mm}$ (Skala: 22) bei sichtbaren und $0,27\text{ mm}$ (Skala: 15) bei ultravioletten Strahlen. Die daraus austretenden Strahlen wurden vor dem Eintritt in die Kürvette durch einen Spalt (ungefähr 2 mm weit) abgesperrt.

TABELLE I.

Filter	Wellenlänge	Skala	Diff.	Filter	Wellenlänge	Skala	Diff.
CuSO ₄	720	0 248	4		555	II 87	9
	715	252	4		550	96	10
	710	256	4		545	106	10
	705	260	4		540	116	11
	700	264	5		535	127	11
	695	I 269	5		530	138	11
	690	274	4		525	149	11
	685	278	4	T +	520	160	13
	680	282	5	Cu(NO ₃) ₂	515	173	12
					510	185	13
	675	287	5		505	198	12
	670	292	5		500	210	15
	665	297	5		495	225	15
	660	302	5		490	240	15
	655	307	5		485	255	15
	650	312	6		480	270	15
	645	318	6				
	640	324	6		475	III 285	15
	635	330	6		470	300	20
TE + CuSO ₄	630	336	7		465	320	20
	625	343	7		460	340	20
	620	350	6		455	360	20
	615	356	6		450	20	23
	610	2	6	Cu-NH ₃ +	445	43	23
	605	8	6	Cu(NO ₃) ₂	440	IV 66	25
	600	14	7		435	91	25
	595	21	7		430	116	27
	590	28	8		425	143	27
	585	36	8		420	170	30
	580	44	8		415	200	40
	575	52	8		410	240	
	570	60	9				
	565	69	9				
	560	II 78	9				

5. Die Kontrollküvette wird durch die Küvette mit der zu messenden Flüssigkeit ersetzt, durch Drehen der Potentiometerkurbeln der Zeiger des Galvanometers auf 0 gebracht und der eingeschaltete Widerstand wird abgelesen. (Es sei J).

6. Durch Wechsel der Küvette wird die Kontrollflüssigkeit wieder eingeschaltet, mit dem Potentiometer gemessen und man überzeugt sich von dem Konstantbleiben der Lichtintensität durch Übereinstimmung der beiden Werte (4 und 6).

7. Der molare Extinktionskoeffizient wird bekanntlich mit folgender Formel berechnet.

$$\beta = \frac{1}{c \cdot d} \ln J_0/J$$

wo J_0/J das Verhältnis der Lichtintensitäten an den Enden des Lichtweges d ist und c die Konzentration der absorbierenden Substanz.

Manche Chemiker wählen als Einheit des Lichtwegs cm, aber als Einheit der Konzentration Mole/Liter. Sie benutzen also zur Definition ein- und derselben Grösse zwei verschiedene Längeneinheiten, cm und dm, was unsachgemäss ist. Wir wählen deshalb in Übereinstimmung mit Warburg als Einheit des Lichtwegs cm und als Einheit von c Mole/cm³.

Bemerkungen.

1. Starkes Licht darf man nicht direkt, bei der Nullstellung des Potentiometers P, einwerfen. Denn dann steigt das Steuergitterpotential der Verstärkerröhre übermässig, so dass das Gleichgewicht des Verstärkersystems gestört wird. Immer beim Wechsel der Wellenlänge wird das Licht abgesperrt und vor der Bestimmung der Photozelle wird ein mässiger Widerstand (100 bis 200 Ohm) des Potentiometers eingeschaltet.

2. *Die gemessenen Werte sind hinreichend genau richtig (Fehler innerhalb 1%), solange J 5 bis 80% von J_0 , nämlich $E (= \log J_0/J)$ 0,1 bis 1,3 bleibt. Sonst muss die zu messende Lösung passend verdünnt bzw. eingengt werden oder die Küvetten-
dicke muss variiert werden.*

Beispiele.

Zur Kontrolle der beschriebenen Anordnung wurden einige Substanzen mit bekannten sowie unbekannten absoluten Absorptionskoeffizienten gemessen. In Abb. 5 bis 7 sowie in Tabelle II und III werden die Ergebnisse dargestellt. Dass man die Konzentrationen der Lösung je nach dem Absorptionsgrad für die verschiedenen Wellenlänge variieren muss, erkennt man aus den Ergebnissen der Tabelle II.

Wir sind jetzt mit der Messung der absoluten Absorptionsspektren des Cytochroms C unter verschiedenen Bedingungen beschäftigt, dargestellt nach Fujita und Kodama aus Rinderherz sowie mit dem spektrophotometrischen Kontrollieren der kolorimetrischen Methode des Vitamins C nach Fujita und Ebihara.

Abb. 5.

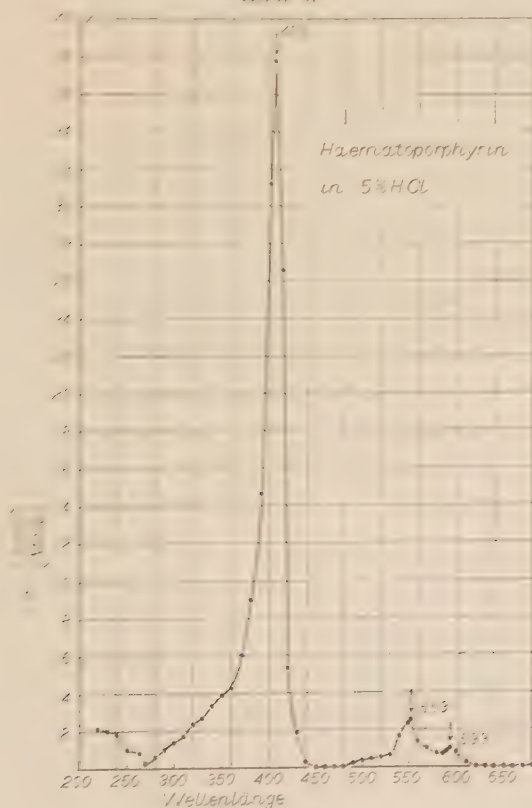


Abb. 6.

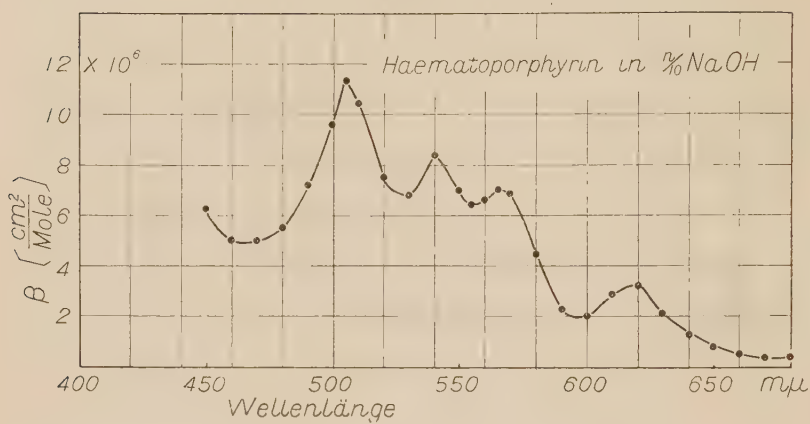


Abb. 7.

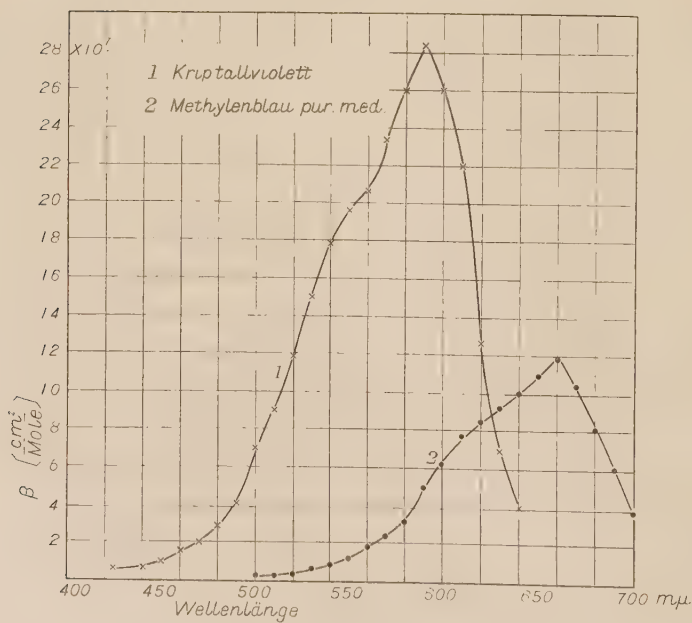


TABELLE II.
Hämatoporphyrin in $N/10$ NaOH.
 $c = 0,1 \text{ mg/cecm} = 0,167 \cdot 10^{-6} \text{ Mole/cecm.}$
 $d = 1,5 \text{ cm.}$

Wellenlänge ($m\mu$)	J_0	J	$\log J_0/J$	$\beta \text{ (cm}^2/\text{Mole)}$
465	13,05	3,9	0,524	$4,8 \cdot 10^6$
505	49,1	2,8	1,242	$11,4 \cdot 10^6$
530	47,1	8,5	0,744	$6,8 \cdot 10^6$
540	44,25	5,3	0,922	$8,4 \cdot 10^6$
555	44,4	9,0	0,693	$6,4 \cdot 10^6$
565	32,55	5,75	0,612	$7,1 \cdot 10^6$
600	47,0	29,05	0,208	$1,9 \cdot 10^6$
620	47,3	20,3	0,368	$3,4 \cdot 10^6$

TABELLE III.
Hämatoporphyrin in 5%ige HCl.
 $d = 1,5 \text{ cm.}$

Wellenlänge ($m\mu$)	$c \text{ (Mole/cm}^3)$	J_0	J	$\log J_0/J$	$\beta \text{ (cm}^2/\text{Mole)}$
205	$0,836 \cdot 10^{-9}$	2,8	0,9	0,492	$902 \cdot 10^6$
230	$16,7 \cdot 10^{-9}$	7,0	4,1	0,232	$21,2 \cdot 10^6$
270	$16,7 \cdot 10^{-9}$	5,9	5,3	0,046	$4,2 \cdot 10^6$
375	$4,18 \cdot 10^{-9}$	10,7	7,0	0,184	$67,5 \cdot 10^6$
405	$4,18 \cdot 10^{-9}$	7,5	0,7	1,030	$379 \cdot 10^6$
450	$16,7 \cdot 10^{-9}$	10,0	9,6	0,018	$1,65 \cdot 10^6$

ZUSAMMENFASSUNG.

Eine lichtelektrische spektrophotometrische Methode mittels Photozellen und Vakuum-Verstärkersystems wird beschrieben, mit welcher die Extinktionskoeffizienten der gelösten Substanzen in jedem Wellenlängenbezirke zwischen 190 bis 730 $m\mu$ genau bestimmbar sind. Die dazu notwendige Technik, Vorsichtsmassregeln und einige Messergebnisse werden mitgeteilt.

LITERATUR.

- Du Bridge (1931): Physic. Review., **97**, 392.
Fujita u. Tomita (1935): Kagaku., **5**, 12.
Tomita (1935): Keio Igaku, **15**, 891.
Tomita (1936): Keio Igaku, **16**, 1041.

THE EFFECT OF ULTRAVIOLET- AND ROENTGEN- RAYS ON THE REDOX-POTENTIAL OF THE FROG MUSCLE IN VIVO.

By

YUKIMARO UCHIMURA.

*(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,
Fukuoka, Nippon. Director: Prof. Dr. K. Kodama.)*

(Received for publication, December 17, 1936)

The wide application for therapie of ultraviolet- and Röntgen-rays has aroused a keen interest on the essential nature of its biological action. Among numerous studies carried out by many investigators on this problem the effect of radiation on the tissue-respiration seems to be one of most interest and importance so that the work in this field has been widely published. But the study on the effect of radiation on the redox-potential of the living tissue seems to be still lacking. Since the recent works of many investigators have clearly demonstrated that the redox-potential is one of most important factors in a physiological function of living tissues, in just an equal degree as hydrogen ion concentration, the author carried out this investigation and found that at moderate dosage of irradiation the reductions potential becomes more prominent, accompanied by the increase of reduced glutathione, the details of which are reported in this paper.

MATERIAL AND TECHNIQUE.

The apparatus for ultraviolet- and Röntgen-rays used in this experiment are as follows:

ultraviolet-rays,

Hanau Co., 100 V, 3 amp.

Hanovia Co., 100 V, 5 amp.

Röntgen-rays,

Shimazu Co., Model D. Coolidge tube R III 2,

the shortest wave length: 0.11 Å,

the strength of second strom: 3 mA.,

Filter: 1 mm Aluminium plate

Dosis: 27 r pro minute

As the test animal frog was used extensively.

I. RADIATION WITH ULTRAVIOLET-RAYS.

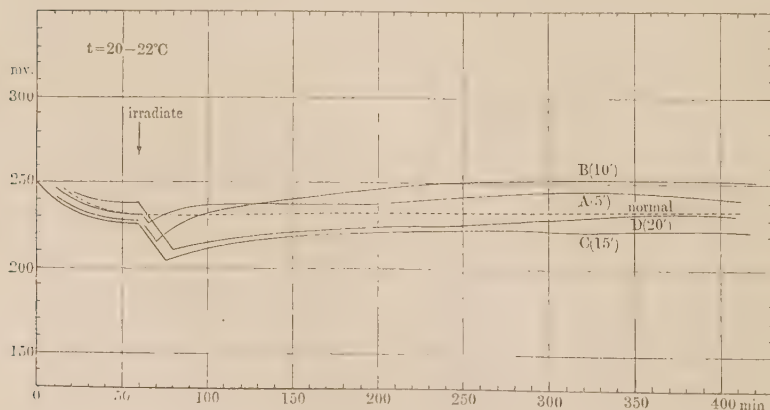
a) *in vivo* Experiment:—

Platin wire electrode was inserted into M. quadriceps, which was made visible by cutting off local skins. The surface of the muscle was covered with the cotton impregnated with Ringer's solution upon which one end of the agar salt bridge was placed, another end being connected with the saturated calomel cell as half element.

The normal redox-potential of the frog muscle measured by this method showed a nearly constant value of $E_h = +230$ mV., which was attained 30 minutes after the insertion of the electrode. When this constancy of the E. M. F. was realized, the muscle was exposed to the rays for various intervals such as 5, 10, 15, and 20 minutes at the distance of 30 cm. from the lamp and the change of the E. M. F. was followed with time. The results are illustrated in Fig. 1.

Fig. 1.

The effect of ultraviolet-radiation on the redox-potential.



As is obvious from this figure the exposure to ultraviolet-rays caused a definite drop of E. M. F. In other words, in muscle, the reductions process became predominant. The extent of this initial drop seems to be nearly parallel with the strength of exposure; as follows:

5'	10'	15'	20'
0-8 mV.	6-12 mV.	16-22 mV.	24-32 mV.

But it can not be overlooked that 15-20 minutes-exposure caused somewhat more an extensive drop. When the radiation was stopped, the recovery was soon followed in cases of 5'-10' exposures and moreover the potential showed higher values than before. Whereas, in the cases of 15'-20' exposures the tendency to recover was very slow, and even after 7 hours the recovery was not complete.

Now, as to the cause of such a change of redox-potential in the tissue *in vivo*, two alternative explanations are probable. Namely, one owing to the local ischaemia and another due to the activation of dehydrogenase system in the tissue. To decide this point the following experiment *in vitro* was undertaken. Here the circulation of blood is out of discussion.

b) in vitro Experiment:—

Soon after a frog was decapitated and completely bled, the M. quadriceps femoris was taken out, and made into paste with 10 times volume *M*/15 phosphate buffer (pH=7.38).

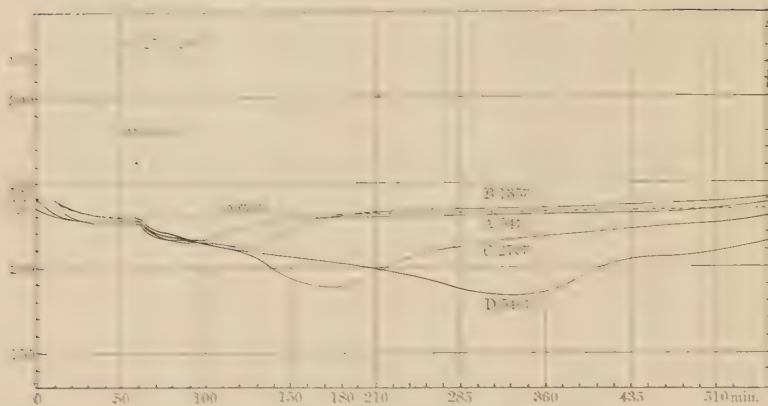
2 cc. of this paste was pipetted into the quartz tube (12.7 cm \times 1.3 cm) with rubber stopper equipped with 4 bores for the platin electrode, agar salt bridge and gas out- and inlet. The air in the tube was replaced by N₂-gas, which was purified by passing through freshly prepared sodium sulfit solution and 10% alkaline pyrogallol solution. During the exposure, N₂-gas was bubbled through at the rate of 80 bubbles per minute. As a control, the quartz tube was wrapped with 4 sheets of black paper.

The results are illustrated in Fig. 2. a.

As seen from the figure when the electrode was immersed in the muscle paste, the E. M. F. showed about $E_h = +300$ mV. which

Fig. 4.

The effect of Röntgen-rays on the redox-potential.



One of the notable differences between the effects of ultraviolet- and Röntgen-rays is the fact that the potential drop, which occurred soon after the irradiation by ultraviolet-rays, was not so apparent in the case of Röntgen-rays. It became gradually prominent after a certain lapse of time and then slowly recovered. It will be also noticed that by small dosages, such as 54 γ and 135 γ , the potential is not only recovered completely to the initial state, but also becomes higher. When larger dosages were applied, however, the potential drop became more marked and the recovery was greatly prolonged and not complete.

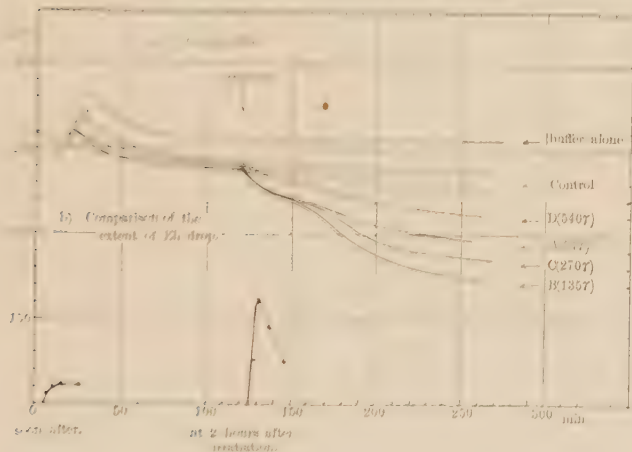
b) in vitro Experiment:—

1) Unwashed muscle.

The experimental procedures are quite the same as in the case of ultraviolet-rays. The results are plotted in the curves shown in Fig. 5.

Directly after the irradiation, the potential changes are not so significant and nearly parallel to the dosages within 135 r. But at larger dosages they are relatively small. This relation is quite interesting when we compare the extent of the potential drop at the lapse of 2 hours after irradiation. Namely, at the dosage of 134 γ , it is most marked and at higher dosages it is rather insignificant.

Fig. 5.
The effect of Röntgen-rays on the reduction potential.



2) washed muscle.

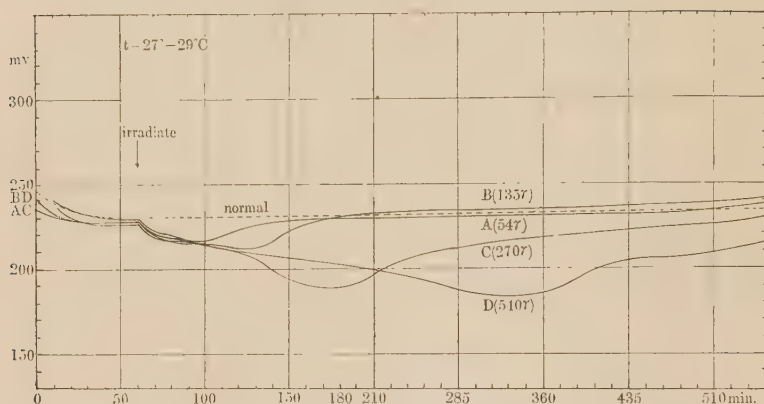
The results with washed muscle are illustrated in Fig. 6.

Fig. 6.
The effect of Röntgen-rays on the reduction potential of washed muscle.



With the washed muscle or the extract alone, no notable change of the potential was observed, but when the washed muscle and the extract were brought together, an apparent drop at irradiation took place. Here again we are assured that the potential drop i.e.

Fig. 4.
The effect of Röntgen-rays on the redox-potential.



One of the notable differences between the effects of ultraviolet- and Röntgen-rays is the fact that the potential drop, which occurred soon after the irradiation by ultraviolet-rays, was not so apparent in the case of Röntgen-rays. It became gradually prominent after a certain lapse of time and then slowly recovered. It will be also noticed that by small dosages, such as 54 γ and 135 γ , the potential is not only recovered completely to the initial state, but also becomes higher. When larger dosages were applied, however, the potential drop became more marked and the recovery was greatly prolonged and not complete.

b) *in vitro* Experiment:—

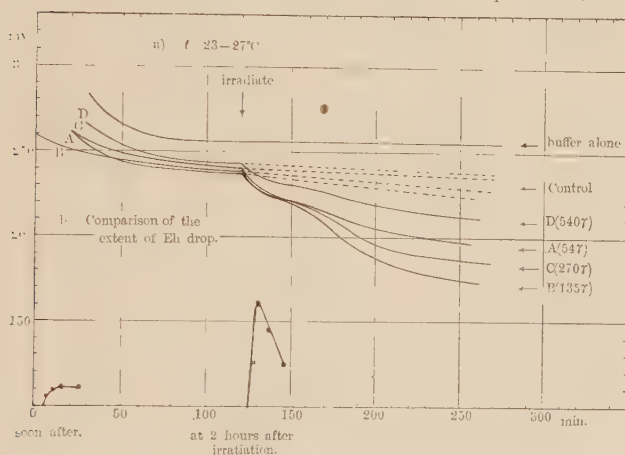
1) *Unwashed muscle.*

The experimental procedures are quite the same as in the case of ultraviolet-rays. The results are plotted in the curves shown in Fig. 5.

Directly after the irradiation, the potential changes are not so significant and nearly parallel to the dosages within 135 r. But at larger dosages they are relatively small. This relation is quite interesting when we compare the extent of the potential drop at the lapse of 2 hours after irradiation. Namely, at the dosage of 134 γ , it is most marked and at higher dosages it is rather insignificant.

Fig. 5.

The effect of Röntgen-rays on the reduction potential.

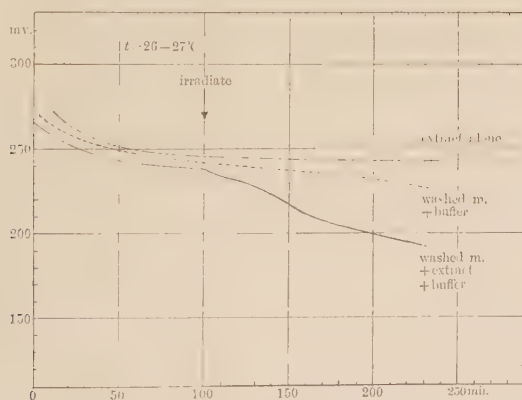


2) washed muscle.

The results with washed muscle are illustrated in Fig. 6.

Fig. 6.

The effect of Röntgen-rays on the reduction potential of washed muscle.



With the washed muscle or the extract alone, no notable change of the potential was observed, but when the washed muscle and the extract were brought together, an apparent drop at irradiation took place. Here again we are assured that the potential drop i.e.

the increase of the reductions potential by light energy is solely realized, when the components of the reducing system are present, since the washed muscle retains dehydrogenase and the extract H_2 -donator.

III. THE EFFECT OF IRRADIATION WITH ULTRAVIOLET- OR RÖNTGEN-RAYS ON THE GLUTATHIONE CONTENTS OF MUSCLE.

As proved potentiometrically in the foregoing experiments, the irradiation with both rays activates the reducing system of the tissue. This should necessarily lead to the increase of reduced glutathione in the tissue. The following experiment gives the evidence that this is really the case.

A frog was decapitated and the femoral muscle was quickly excised out and triturated. An aliquot portion of this muscle paste was weighed out into quartz tube, and diluted with double amount of $M/15$ phosphate buffer ($pH=7.38$). Purified N_2 -gas was bubbled through for 60-90 minutes, the tube was stoppered airtight, and subjected to the irradiation with ultraviolet- or Röntgen-rays of various dosages.

The glutathione contents was measured by the Fujita's metaphosphoric acid method (1934), before and after the irradiation. The results are summarized in Table I.

It will be seen from the table that by replacing air with N_2 -gas, the amount of reduced glutathione increased in a noticeable manner. This increase became more prominent by irradiation and really was parallel to the irradiation-time.

The results of the experiments with Röntgen-rays are indicated in Table II.

When the amount of reduced glutathione was measured soon after the irradiation, no significant difference was observed between 131 γ and 140 γ . But when measured 2 hours after the irradiation, the reduced glutathione contents in the case of less dosage was rather larger. From this fact it will be concluded that the reduced glutathione is partially destroyed by longer exposure. This stands quite in accord with the foregoing experimental results of potentiometrical study, and might be explained by assuming that by the

TABLE I.

Change of the reduced glutathione (GSH) contents of the muscle
at irradiation with ultraviolet rays.

No.	Irradiation	Duration of N ₂ -gas passage.	Irradiation time	Contents of GSH (mg. %)	Increase of GSH by irradiation (A - C)
I	B			21.5	1.5
	A	60'	10'	26.1	
	C	60'	10'	24.6	
II	B			21.5	0
	A	60'	10'	27.6	
	C	60'	10'	27.6	
III	B			23.0	2.1
	A	90'	10'	28.2	
	C	90'	10'	26.1	
IV	B			18.4	1.6
	A	90'	10'	24.6	
	C	90'	10'	23.0	
V	B			18.7	1.6
	A	90'	10'	24.9	
	C	90'	10'	23.3	
VI	B			23.9	3.1
	A	90'	20'	30.7	
	C	90'	20'	27.6	
VII	B			20.9	2.4
	A	90'	20'	27.6	
	C	90'	20'	25.2	
VIII	B			23.3	3.7
	A	90'	20'	31.9	
	C	90'	20'	28.2	
IX	B			22.1	3.1
	A	90'	20'	28.9	
	C	90'	20'	25.8	
X	B			21.5	2.5
	A	90'	20'	27.0	
	C	90'	20'	24.5	

B....Before N₂-gas passage and irradiation.

A....After N₂-gas passage and irradiation.

C....After N₂-gas passage and irradiation, but at irradiation the quartz
tube was wrapped with 4 sheets of black paper.

TABLE II.
Change of the reduced glutathione (GSH) contents of the muscle
at irradiation with Röntgen-rays.

No.	Irradia- tion	Dura- tion of N ₂ -gas passage	Dosage	Contents of GSH (mg. %)		Increase of GSH by irradiation (A-C)	
				soon after irradia- tion	at 2 hours after irrad.	soon after irradia- tion	at 2 hours after irrad.
I	B			17.8			
	A	90'	135r	25.2	31.3	0	6.1
	C	90'	135	25.2	25.2		
II	B			23.3			
	A	90'	135	30.7	35.6	1.3	3.7
	C	90'	135	29.4	31.9		
III	B			18.4			
	A	90'	135	25.8	29.5	1.2	3.7
	C	90'	135	24.6	25.8		
IV	B			22.1			
	A	90'	135	29.5	35.6	1.3	4.9
	C	90'	135	28.2	30.7		
V	B			22.7			
	A	90'	135	29.2	32.4	1.0	2.3
	C	90'	135	28.2	30.1		
VI	B			23.3			
	A	90'	540	29.5	31.3	1.3	1.8
	C	90'	540	28.2	29.5		
VII	B			19.6			
	A	90'	540	25.8	27.6	1.2	2.4
	C	90'	540	24.6	25.2		
VIII	B			18.4			
	A	90'	540	27.0	27.6	2.4	0
	C	90'	540	24.6	27.6		

B....Before N₂-gas passage and irradiation.

A....After N₂-gas passage and irradiation.

C....After N₂-gas passage and irradiation, but at irradiation the quartz
tube was covered with 5 mm. lead plate.

irradiation of higher dosage, a certain peroxide will be produced which may reoxidize the reduced glutathione. That peroxide produced from various chemical substances by irradiation has been proved by my colleague Notomi in this laboratory, and will be soon published.

SUMMARY.

1. The redox-potential of normal frog muscle is nearly ± 230 mv. Eh.
2. Irradiation with ultraviolet- or Röntgen-rays causes the increase of the reduction-potential, which is highest at the dosage of 10 minutes exposure with ultraviolet-rays and at 135 r with Röntgen-rays. At larger dosages this increase was rather inhibited.
3. With ultraviolet-rays the rise of the reduction-potential took place soon after the irradiation, but with Röntgen-rays it happened after certain intervals.
4. The above observed change of the potential took place only when each components of the reducing system in muscle (Dehydrogenase + H_2 -donator) are all present.
5. The recovery of the potential to the initial value took place earlier in the case of ultraviolet-rays than in the case of Röntgen-rays.
6. There exists an optimal dosage of irradiation for the increase of the reduced glutathione. By applying excess it was rather inhibited.
7. It is proposed that the biological effect of light might be partially sought in the activation of the reducing agents in the tissue.

The author is deeply indebted to Prof. Dr. K. Kodama for his kind direction and criticism and to Prof. M. Shiraki for his kind encouragement throughout this work.

REFERENCES.

- Fujita, A. and Iwatake, D. (1934): Tokyo Iji Shinshi, **58**, 1845.
 Gottschalk, A. u. Nonnenbruch, W. (1923): Strahlentherapie, **15**, 98.

STUDIES IN EXPERIMENTAL SCURVY.

XXXV. On Bezssonoff's Reacting Substances, and on its Identity to Vitamin C.

By

HIDEMARO TSUGE.

(From the Laboratory of Biological Chemistry, Tokyo Jikei-Kwai Medical College, Tokyo. Director: Prof. T. Nagayama.)

(Received for publication, December 19, 1936)

I. INTRODUCTION.

Since the discovery of vitamin C, a considerable number of studies have been published. In our laboratory, many studies have been already made under the direction of Prof. Nagayama, and others are still in progress.

It seems that the study of vitamin C is, as whole divided into two propositions; one is for the biochemical or nutritive action, the other for the chemical construction, of vitamin C, the former having been the motive of its discovery, and, accordingly, been well studied. On the contrary, owing to the unstable and fragile property of the vitamin, and to the reason that the substance could not be purified, the chemical construction was not clear until Szent-Györgyi (1927) isolated hexuronic acid crystalline from the suprarenals of cows and some vegetables. Since it has been clearly verified by a number of investigators (Tillmanns and Hirsch (1932); Dalmer and Moll (1932); Brüggemann (1932); Maruyama (1933); etc.) that the hexuronic acid, recently called "Ascorbic acid," is vitamin C. Phenol-dichlorodiphenol method for the hexuronic acid is generally applied for the determination of the vitamin in various materials. Before Szent-Györgyi discovered the ascorbic acid, animal tests were used to be employed for proving the presence of vitamin C. Bezssonoff (1921) recommended a reagent which is made up of solution of sulphuric acid and of phosphomolybdotungstic acid (17WO_3)

(MoO_3) (P_2O_5) $25\text{H}_2\text{O}$ which is turned to blue or blueviolet by the presence of antiscorbutic factor. Thus it has been discussed whether or not the reaction originates from the existence of the antiscorbutic substance or from the existence of other substances. (Zilva, 1923).

Many view for the Bezssonoff's reaction will be summed up as follows: (1) The reaction is not distinctly special (Browning, 1931). (2) The reaction originates in vitamin C itself or in a compound of vitamin (Bezssonoff, 1922). (3) The reagent reacts upon some of the phenols positively.

Loewy (1925) experimented on dealing with many fruits, vegetables and some other materials by the use of the reagent and compared its results with those which were obtained when tested with animals by Koopman and Funk. According to his experiments, it was recognised that in general, both of the results run parallel. We have performed a series of experiments on relationship between the Bezssonoff's reacting substance and the antiscorbutic factor, vitamin C.

II. MATERIAL AND METHOD.

Throughout the experiments, care was taken in such a way as Bezssonoff described. To 10 cc. of the test juice in a sediment tube of 25 cc. in volume, 20 cc. of the Bezssonoff's reagent was mixed by means of Ostwald pipette, and warmed at 70° – 80°C in a water bath for 5 minutes and then centrifuged. The supernatant fluid was colorimetrically measured by the use of Buerker's colorimeter.

Radishes, tomatos, lemons, oranges (Mandarin), malts, organ tissues etc, were chiefly employed as materials for the present experiments. In cases when the colors of the juices which were obtained by pressing those fruits and vegetables would prevent this color reaction, Japanese acid earth was used so as to take off such colors of the juices. The juices were diluted with an adequate volume of distilled water, if the color in the reaction were too deep. For the experiment dealing with the organ extracts, guinea pigs were used.

This reaction occurred only in acidified medium but never in alkalized medium.

When the Bezssonoff's reagent is added with the hydrochinone solution which is previously alkalized with plenty of NaOH, this Bezssonoff's reaction to be taken place is negative. On the other hand, if the hydrochinone solution alkalized with NaOH is treated with H_2SO_4 , the Bezssonoff's reaction becomes positive. If NaOH is added to the Bezssonoff's reagent and then the solution of hydrochinone is added to it, in an alkalized condition, it gives negative reaction, but if the reagent is again acidified with H_2SO_4 and the solution of hydrochinone is added to it, it reacts positively. The same can be said with the juice made up of radishes.

When the Bezssonoff's solution is poured into the juices made up of either radishes or lemons, there appears a bluish violet color, though simultaneously grayish white precipitates are produced. For colorimetric treatments it is usually centrifuged, to get rid of the precipitate and only the bluish violet solution is available for the experiment. The grayish white precipitate is slightly soluble by heating, and dissolves readily by NaOH. This precipitate reacts negatively for the Millon's and Biuret reaction.

III. ON THE REAGENT.

Concerning the making up of the reagent it will be outlined as follows: Bezssonoff (1921) has prepared it using the Folin's reagent. This solution turns to blue by means of mono-, di-, tri-phenol and these derivatives, and also it reacts positively by the use of vegetables which contain antiscorbutic substances. Furthermore, he (1922) has published another important paper entitled "Color Reaction of Antiscorbutic Extracts and of Polyphenols with Phosphomolybdotungstic Acid", the details of which will be mentioned below.

44 gm. of sodium tungstate and 24 gm. of phosphomolybdic acid are dissolved in 400 cc. of distilled water from which all organic substances have been previously removed with per-

manganate, and there is then added 5 cc. of 85% H_3PO_4 to the solution, warmed for 2 hours at a temperature of $50^\circ\text{--}60^\circ\text{C}$, and 45 cc. of 5N H_2SO_4 are poured gently, cooled, and stood still. In such a way some crystals are obtained. The crystals are washed with 15% H_2SO_4 and again dissolved in 100 cc. of distilled water. By adding 17 cc. of 50% H_2SO_4 to this solution other crystals may be produced again. Finally 15 gm. of the crystals just obtained are dissolved in 100 cc. of 5% H_2SO_4 . This is the so-called Bezssonoff's reagent.

As regards the Bezssonoff's reagent, he states that the reagent turns to a yellowish brown, by the addition of guajacoal, but no coloration by uric acid and glucose, it turns to an intense blue by diphenol (hydrochinone), a red-violet changed to a blue by pyrocatechol and catechol, and a yellow-brown by procatechol, pyrogallie acid and tannine. No coloration is produced by oreinol, resoreinol and phloroglucinol. All antiscorbutic vegetable extracts give a blue color. However, after treatment of destroying the vitamin, the blue color in the reaction above mentioned is not produced, that is, the reaction is negative. It seemed probable, therefore, that the reaction is established by the action of polyphenol which constitutes vitamin C, and is readily split off from the latter (Bezssonoff, 1922).

Again Bezssonoff (1921-1924) has published a paper under the title of "Simplified Method Preparation of the Bezssonoff's Reaction for vitamin C and some Polyphenol", in which he describes that the crystals may be obtained by a similar procedure of the former method.

Besides these papers, Bezssonoff (1924-1926) answered Zilva's objection by saying that if the substance which reacts positively is not warmed and acidified with hydrochloric acid, it may react negatively. However, Zilva and Connel (1924) remained still doubtful about Bezssonoff's reaction.

In the present study I have thoroughly prepared the reagent according to extensive information by Bezssonoff, and I could obtain the beautiful yellowish white crystals. If the crystal remains for a considerable time, it may turn to a greenish blue. As

Bezssonoff speaks, when 15 gm. of the crystals are dissolved in 100 cc. of 5% H_2SO_4 , it indeed changes to a transparent yellowish solution.

IV. EXPERIMENTAL.

1. *Permeability.*

For the experiment of permeability, a collodion membrane sack, which was previously tested by using the congo-red solution, was employed. 100 cc. of the fresh radish juice are put into this membrane sack, and the sack is placed in a large dish capable of holding 500 cc. which contains distilled water. Twenty-four hours after having been left in the dish, the distilled water is examined for the Bezssonoff's reaction. According to this, the reaction is positive.

A collodion membrane sack prepared in the same manner as above, in which 100 cc. of the fresh radish juice are put, is placed in running water for 2 days, and then the residue is tested on Bezssonoff's reagent. The coloratoin is negative or otherwise very slight.

The Bezssonoff's reacting substance, accordingly, is to be dialized, and the dialysis of the reacting substance corresponds to that of vitamin C (Zilva and Connell, 1924).

2. *Property for the basic lead acetate.*

5 gm. of basic lead acetate are added to about 30 cc. of radish juice and filtered. The filtrate is negative for the Bezssonoff's reaction. The precipitates are dissolved in 36% acetic acid and 10% HCl is added in order to take off the lead. After this it is centrifuged to obtain the solution. It is positive for the Bezssonoff's reagent. That is to say, the substances which show the Bezssonoff's reaction are precipitated by addition of the basic lead acetate. It is accordingly emphasized that the nature of such substances reacted upon the basic lead acetate, corresponds to that of vitamin C (Vedder, 1927).

3. *Adsorptiveness.*

In order to detect a relation between the substances above mentioned and the vitamin C concerning their adsorptiveness, talc powder, Japanese acid earth, calcium carbonate precipitate, sulphur snow, caoline, bone coal, and blood coal were used. Several flasks containing each 20 cc. of radish juice filtrated after pressing, are added with a spoonful of adsorbent as described above, and stirred violently. After filtration the solution is employed for the examination of the Bezssonoff's reaction. The result will be noted in comparison with the adsorptiveness of vitamin C as follows (Table I):

TABLE I.

Adsorbent	The adsorptiveness of Bezssonoff's reacting substance	Adsorptiveness of Vitamin C
Talc powder	(-)	—
Japanese acid earth	(-)	(-)
Sulphur snow	(-)	—
Caolin	(-)	—
Calcium carbonate precipitate	(-)	—
Bone coal	(+)	(+)
Blood coal	(+++)	(+)

Remarks: (+) indicates that the adsorption takes place. (-) indicates that no adsorption occurs. — indicates that it is not be tested.

As seen from the Table I, blood coal indicates the strongest adsorptiveness; and the next is bone coal, while none of the others shows any adsorptiveness.

The nature of such substance which reacts as to be adsorbed by blood coal is quite similar to that of adsorptiveness of vitamin C (Mathews, 1930).

100 cc. of fresh radish juice filtrate are added with 5 gm. of blood coal and stirred for 10 minutes by means of a shaking machine, and finally filtrated. The filtrate is negative for the Bezssonoff's reaction.

The solution obtained by washing the precipitates with distilled water is negative for the Bezssonoff's reaction.

The precipitates are added with 100 cc. of 5% H_2SO_4 and are stirred for 10 minutes by the shaking machine so as to isolate the reacting substances, and filtrated. The filtrate is positive for the Bezssonoff's reaction. When the reaction of this solution is colorimetrically compared with that of the fresh radish juice in a quantitatively corresponding relation, it has been found that the color intensity of the former is about one third of that of the latter. It is, however, considered to be possible to make the degree of the intensity of the isolated solution stronger than that indicated above by means of an adequate manipulation.

4. *Relation to some oxydation reagents.*

For the experiment, filtered and clear juice of fresh radishes is employed. With 3% or 30% H_2O_2 the juice is oxidized and then the Bezssonoff's reagent is added to it, and the reaction is examined. In this case the degree of reaction is reduced much more than that of the fresh juice. The degree of the declination is more remarkable when using 30% H_2O_2 than 3% H_2O_2 . When oxidized by sodium peroxide, it is only to make the reaction somewhat weaker.

In case of the oxydation with potassium permanganate, it requires 33.5 cc. of 5% potassium permanganate for 20 cc. of the juice to be completely oxidized. It is warmed in the water bath until there is only a slight trace of the color of potassium permanganate in the final reaction. After this the pink color is taken off with oxalic acid and added with Bezssonoff's reagent. No color appears there. It is, therefore, considered that the reacting substance has been oxidized by potassium permanganate. It is a decided matter that the reduced form of ascorbic acid reacts for 2,6-dichlorophenolindophenol, whereas the dehydroascorbic acid, oxidised form, does not. To investigate whether the dehydroascorbic acid reacts for the Bezssonoff's reagent, we have performed the following experiment. A certain amount of reduced form of ascorbic acid is oxidised by bromine water to de-

hydroascorbic acid. The bromine in an excess is removed by aerating, for 30 minutes, and the HBr is removed by calcium carbonate. The dehydroascorbic acid thus obtained reacts negatively for the Bezssonoff's reagent. The reaction appears again when the dehydroascorbic acid is reduced to the ascorbic acid by sulphuretted hydrogen. Thus the Bezssonoff's reacting substances are oxidized by oxydation reagents and the reaction becomes weaker or otherwise diminishes when the substances are treated with perhydrol, sodium peroxide, potassium permanganate, or bromine. It is concluded, accordingly, that the substance corresponds to vitamin C in the nature concerned (Zilva, 1924).

5. Stability to Heat.

When 10 mg% ascorbic acid containing fresh radish juice is heated on a sand bath for 2 hours, the content of the acid is reduced to 0.8 mg%, and its Bezssonoff's reaction is also weakened. The rate of the Bezssonoff's reaction seems to run parallel with that of the decrease of ascorbic acid. 10 mg% ascorbic acid solution, reacts positively for the Bezssonoff's reaction, whereas the reaction becomes negative by heating the acid solution in the same manner as mentioned above. When the same fresh radish juice is heated in an autoclave at 130°C for 1 hour, the ascorbic acid content is reduced from 10 mg% to 1 mg%, and the Bezssonoff's color reaction is also markedly reduced. They also run almost parallel. However, when 10 mg% ascorbic acid solution is treated in the same manner mentioned above, it is reduced to 0.01 mg% and the Bezssonoff's reaction appears no more. The ascorbic acid seems to be protected better in the radish juice than in the distilled water against the heat. It may be probably due to the presence of colloid substance such as proteins in the former. The destruction rate of ascorbic acid by autoclaving is less than that by heating on a sand bath. The discrepancy between them may be related to the oxydation process.

6 Properties for Acid and Alkali.

After 5 cc. of the fresh radish juice which contains 10 mg%

ascorbic acid is added with 3 cc. of 10% NaOH and boiled for 5 minutes, it is acidified with complete amount of H_2SO_4 , and then it is tested on the Bezssonoff's reaction. Hereby, it reacts negatively, and the ascorbic acid is reduced to 0.8 mg%. When the pure ascorbic acid solution in the same concentration as mentioned above is treated with the same manner as the radish juice, the acid is reduced to 0.02 mg%, and the Bezssonoff's reaction appears no more. It has been also demonstrated that the resistance of the ascorbic acid in the radish juice is stronger than that in a distilled water. The resistance to alkali of the Bezssonoff's color reacting substance is just the same as the ascorbic acid. When the fresh radish juice is acidified by an addition of HCl, H_2SO_4 or CH_3COOH , the Bezssonoff's reaction is still positive.

7. Solubility.

The Bezssonoff's reacting substance is soluble in water and alcohol. However, it is not dissolved in ether, acidified ether and chloroform. The relationship between the properties of the Bezssonoff's reacting substance and of the Vitamin C is tabulated in Table II.

TABLE II.
Comparative table on the properties of Bezssonoff's reacting substance and Vitamin C.

	Bezssonoff's reacting substance	Vitamin C
Permeability	permeable	permeable
Precipitation by basic lead acetate	precipitated	precipitated
Adsorptiveness for Japanese acid earth	not adsorbed	not adsorbed
Adsorptiveness for blood coal	adsorbed	adsorbed
Oxydization	destroyed by oxydation	destroyed by oxydation
Heat stability	unstable	unstable
Water solubility	soluble	soluble
Alcohol 50% solubility	soluble	soluble
*Synthesis by germination	synthesised	synthesised
Destruction by alkali (boil)	destroyed	destroyed
Destruction by weak acids	not destroyed	not destroyed

* It will be reported in the Sei-i-kwai Medical Journal.

8. *Is the Bezssonoff's Reaction Specific for the Vitamin C in Natural Foods?*

We have performed the following experiments to know whether the vitamin C solely reacts positively for the Bezssonoff's reagent when natural foods will be tested. For the purpose we have prepared the metaphosphoric acid (2%) extracts of some fruits and vegetables such as apples, pears, lemons, mandarin oranges, spinach and radish roots, and their ascorbic acid contents have been determined by means of 2,6-dichlorophenolindophenol. Also we have prepared the ascorbic acid metaphosphoric acid solutions of which concentrations are equivalent to the vitamin C contents in the extracts mentioned above respectively. The color intensity of them produced by the Bezssonoff's reagent has been compared respectively. According to these experiments, the color intensity of the former is always stronger than that of the latter, especially in apples and pears. These facts suggest to us that there are other Bezssonoff's reacting substances, than the vitamin C in the fruits and the vegetables. Therefore we can not rely upon the Bezssonoff's reaction entirely for the test of the vitamin C in natural foods.

When the whole Bezssonoff's reacting substances in the fruits and the vegetables should be regarded as vitamin C, and compared with the true ascorbic acid content determined by 2,6-dichlorophenolindophenol method, the value of the former is extremely greater than that of the latter.

The results are shown in Table III.

TABLE III.

	Ascorbic Acid Content Determined by Tillmanns' Method	Ascorbic Acid Content Calculated regarding that the Whole Bezssonoff's reacting Substances should be Vitamin C mg%
Apple	±	+++
Pear	±	+++
Radish	6.15	10.3
Lemon	37	48
Mandarin Orange	11.7	12
Spinach	98	166

9. *Comparison of the Bezssonoff's Reaction for Extracts from various Organs of the Scorbutic and the Normal Guinea Pigs.*

Immediately after the guinea pigs, which have been taken with scorbutic disease by feeding with the vitamin C free diet, are killed by means of venesection, their organs are taken out. To these are added, 10% trichloroacetic acid in proportion of every 30 cc. to 1 gm of the organs to be examined, and they are macerated in order to obtain their extracts. Every 10 cc. of the filtrate is added with 2 cc. of the Bezssonoff's reagent, heated for several minutes at 60°–70°C. The normal guinea pigs are also treated with the same procedure as made in the scorbutic animals, and the color intensity for the Bezssonoff's reagent of the filtrate of the respective organ extract obtained from both animals is colorimetrically compared. The ascorbic acid contents of every organ tissue of the both animals are determined by means of 2,6-dichlorophenolindophenol. According to the experiment, it is proved that the ascorbic acid contents in the various organs of the scorbutic guinea pigs are decreased respectively in comparison with those of the normal ones. Since the ascorbic acid contents in the organs of guinea pigs except the suprarenal glands are generally small, the Bezssonoff's reaction is almost negative except the suprarenals. It is not yet decided whether the positive Bezssonoff's reaction is due to the ascorbic acid or adrenalin which reacts strongly positive for the Bezssonoff's reaction.

In order to know the presence of Bezssonoff's reacting substance in the rind of suprarenals, we used the suprarenal gland of an ox. The suprarenal gland was separated into a marrow and a rind. Each 1 gm of the marrow and the rind were extracted with 10% trichloroacetic acid as above mentioned, and tested upon the Bezssonoff's reagent. Then a comparison was colorimetrically made between both extracts obtained, and the colorimetric reading is as follows:

Extract of the marrow: Extract of the rind=5.8:10. This result indicates the fact that the rind of the suprarenals of ox con-

tains rather a large amount of the Bezssonoff's reacting substance. It is a well known fact that the rind of suprarenal glands contains a large amount of ascorbic acid. This fact corresponds with each other.

*10. Increase and Decrease of the Reacting Substances
and the Ascorbic Acid Involved in both
Fresh and Stale Radish Juice.*

To detect whether any difference between the lemon stored two months prior to the experiment, and that of a fresh one, may exist in the Bezssonoff's reaction and in the ascorbic acid content when they are treated with equal volume, the present investigation is carried out. The fresh lemon employed for the experiment is certainly strong positive for the Bezssonoff's reaction, and its ascorbic acid content is shown to be 29.1 mg% by means of 2,6-dichlorophenolindophenol method. When 30 gm. of the fresh lemon is left to stand at room temperature for two months, its weight decreased to 2.5 gm. Its ascorbic acid content is reduced to 6.1 gm%, and at the same time the intensity of the Bezssonoff's reaction is also decreased. Just the same results as in the case of lemon are also obtained in a radish root. The weight of a radish root is decreased to about one tenth when it is allowed to stand at room temperature for about two months. Hereby its ascorbic acid content is reduced from 24.9 mg% to 0.3 mg%, and the color intensity of the Bezssonoff's reaction is weakened to a great extent. These facts indicate that the decrease of the Bezssonoff's reacting substance occurs in parallel, with that of its ascorbic acid content by allowing it to stand in a room.

*11. On the Influence of various Treatments upon the
Intensity of the Bezssonoff's Reaction.*

The color intensity of the Bezssonoff's reaction for a fresh radish juice is strengthened when treated with 2% metaphosphoric acid, 5% trichloroacetic acid, sulfosalicylic acid, acetic acid and sodium chloride, Japanese acid earth, and infusorial earth etc. It may be due to the deproteinisation by these reagents.

12. *Sensitiveness of the Bezssonoff's Reaction for the Ascorbic Acid.*

The pure ascorbic acid solutions of various concentration ranging 0.05 mg%–16 mg% were tested upon the Bezssonoff's reaction. The results are as follows:

Concentration of Ascorbic Acid mg%	Intensity of the B-Reaction
16.0	++++
8.0	+++
4.0	++
2.0	++
1.0	+
0.8	+
0.4	+
0.2	±
0.1	—
0.05	—

It can be seen that the Bezssonoff's reaction will serve to detect ascorbic acid when present in a concentration of more than 0.2 mg%.

13. *On the Reaction of Bezssonoff's Reagent for the Phenols.*

Bezssonoff (1921) has already described in his first paper on the Bezssonoff's reaction that the Bezssonoff's reagent reacts positively for the phenols. Later he has mentioned that it reacts with the diphenol.

We have also examined the relationship between the chemical configuration of phenols and the Bezssonoff's reaction.

Monophenol does not show this reaction, and its derivatives such as nitrophenol, tyrosine, thymol, etc. are all negative in the reaction. As regards diphenol *ortho*- (viz. *brenz-catechine*) and *para*-diphenol (viz. *hydrochinone*) indicate positive reaction, while *meta*-diphenol (viz. *resorcinol*) indicates negative reaction. The same can be said concerning the reaction of these derivatives, that is to say, both *guajacol* and *adrenaline* which are a derivative of *brenzcatechin* are positive in the reaction, and *arbutine* which is a

derivative of hydroquinone is also positive. Veratrol which is neutral methyl-ether produced from brencatechin by substitution of hydrogen in its OH with 2 methyl components in negative, and hydroquinone dimethylether produced from hydroquinone by the same treatment as in the case of veratrol is also negative.

Chinhydron, which is regarded as a form obtained by elimination of one of hydrogen involved in its hydroxyl groups from hydroquinone is positive. However, chinone from which two of hydrogen is removed does not show any reaction. In triphenols, both vicinal (Pyrogallol) and symmetric triphenol (Phrologrucinol) react negatively whereas asymmetric one (oxyhydrochinon) is positive.

The relationship between the chemical configuration of phenols and the Bezssonoff's reaction is tabulated in Table IV.

To recapitulate, the both *ort*- and *para*- among diphenols are positive in the reaction and it seems that the presence of hydrogen

TABLE IV.



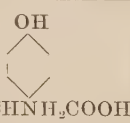
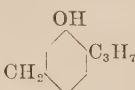


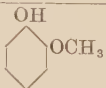

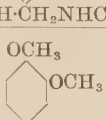


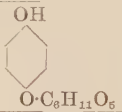


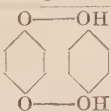

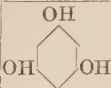
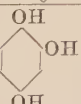
		Structural formula	Bezssonoff reaction to phenols	Derivatives		
					Structural formula	Bezssonoff reaction
Monophenols	Phenol	OH 	(-)	Kresol	OH 	(-)
				Tyrosin	OH 	(-)
				Tymol	OH 	(-)
				O-Nitro-phenol	OH 	(-)

TABLE IV—(continued).

Diphenols	Brenz- catechin (ort—)		(+)	Guajacol		(+)
				Adrenalin		(+)
				Veratrol (Brenz- catechin- dimethyl- ether)		(-)
	Resorcinol (meta—)		(-)			
	Hydro- chinon (para—)		(+)	Arbutin		(-)
				Hydro- chinon- dimethyl- ether		(-)
				Chinon		(-)
				Chinhy- dron		(+)
	Pyrogallol		(-)			
	Phrolog- rucinol		(-)			
	Oxyhydra- chinon		(+)			

Remarks: (+) indicates that Bezssonoff's reaction is positive while (-) indicates that it is negative.

involved in its hydroxyl groups is an important factor for its positive reaction. Thus, it is suggested that there exists a relationship between the Bezssonoff's reagent and the hydrogen in hydroxyl groups of phenol. Furthermore, the reaction of the hydrogen generated from the Bezssonoff's test reagent into which a piece of zinc was put was tested. The hydrogen generated reduces the test reagent showing a bluish violet color, and its reaction is positive. When the reduction still continues, the bluish violet turns to a blue.

If the Bezssonoff's test reagent reduced in the same manner as above mentioned is added with bromine water in order to oxidize, the reacting color disappears and turns to the original color. Again, if the bromine is removed from the solution by addition of chloroform and a piece of zinc is put into the solution, there appears a bluish violet color again. Accordingly, the chemical change to occur in the reaction is reversible, representing that the color appears when reduced, but disappears when oxidized.

14. *Irradiated Narcotine.*

O. Rygh and A. Rygh (1932) reported that the irradiated narcotine gives an antiscorbutic action. According to their information, the Bezssonoff's reaction was examined with narcotine which was previously irradiated (Shimada, 1933). The results, however, were negative.

Our experimental result is as follows: Irradiated narcotine is dissolved in 5% H_2SO_4 . If it is added to the Bezssonoff's test reagent, there appears yellowish gray precipitates indicating negative reaction. Even when heated it is also negative.

V. CONCLUSIONS.

1. What the relationship exists between the Bezssonoff's reacting substance and the vitamin C has been studied.
2. The Bezssonoff's reacting substance and the vitamin C are both soluble in water and in 50% alcohol.
3. The both substances are permeable through the colloidal membrane.

4. They have the same adsorbiveness, that is, they are adsorbed by bone coal and by blood coal, whereas not by Japanese acid earth.

5. The both substances are completely precipitated by basic lead of acetate.

6. The Bezssonoff's reacting substances are oxydized by various oxydation reagents as in the vitamin C. The dehydroascorbic acid which reacts negatively for the Bezssonoff's reagent comes to show again a positive reaction if it is reduced.

7. Both the Bezssonoff's reacting substance and the ascorbic acid are unstable against the heat.

8. Both substances are also destroyed by alkali whereas they show more resistance against weak acid.

9. When a fresh lemon is allowed to stand at room temperature for two months, the intensity of Bezssonoff's reaction for the lemon juice is reduced in parallel with the decrease of the ascorbic acid content in it.

10. It is proved that the ascorbic acid contents in the organs of the scorbutic guinea pigs are decreased respectively in comparison with those of the normal ones. But since the ascorbic acid contents in the organs of even normal guinea pigs is so small that the Bezssonoff's reaction is almost negative except the suprarenal glands, it is impossible to compare one with another.

11. The rind of the suprarenals of an ox which is rich in ascorbic acid contains also rather a large amount of the Bezssonoff's reacting substance.

12. The ascorbic acid reacts positively for the Bezssonoff's reaction, and the Bezssonoff's reacting substance in a fresh radish root is identical with vitamin C in various properties.

13. It has, however, to be noticed that we can not rely upon the Bezssonoff's reaction without fail for the test of vitamin C in natural foods because there are very often some other Bezssonoff's reacting substances than the vitamin in fruits and vegetables.

14. Monophenol, its derivative and triphenol do not show the Bezssonoff's reaction whereas the both *o*- and *p*-diphenol react positively. When one of hydrogen in hydroxyl groups of the

diphenol is substituted by CH_3 , the reaction remains unchanged, while when two of H in OH groups are removed or are substituted by CH_3 , the products show no longer a color reaction. These facts indicate that the Bezssonoff's color reaction of the polyphenol is closely related to the hydrogen involved in hydroxyl groups of the molecule.

REFERENCES.

- Bezssonoff, N. (1921): *Compt. rend. acad. soci.*, **173**, 917.
" " (1921): *Biochem. J.*, **17**, 420.
" " (1922): *Chem. Abst.*, **16**, 1782.
" " (1924): *Biochem. J.*, **18**, 384.
" " (1924): *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **6**, 220.
" " (1926): *Compt. rend.*, **182**, 1223.
Browning, Ethel (1931): *The Vitamin, Monographs of the Pickett-Thomson Research Laboratory*, vol. I.
Brüggemann (1932): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **210**, 94.
Dalmer and Moll (1932): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **209**, 211.
Hsein Wu (1920): *J. Biol. Chem.*, **43**, 189.
Loewy, E. (1925): *Münch. Med. Wochenschr.*, **72**, 1780-1.
Maruyama (1933): *Scientific Papers of the Institute of Physical and Chemical Research*, **20**, 259.
Mathews (1930): *Physiological Chemistry* 604, 5th Edition.
Nagayama, T. (1927): *Nippon Seikagaku Kaiho*, vol. **3**, No. 4.
Rygh, O. and Rygh, A. (1932): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **204**, 105-11.
Shimada, J. (1933): *J. Biochem.*, **17**, 395.
Szent-György (1927): *Nature*, **119**, 782.
Tillmanns and Hirsch (1932): *Biochem. Z.*, **250**, 312.
Vedder, E. B. and Lawson, W. B. (1927): *J. Biol. Chem.*, **73**, 215-8.
Zilva (1924): *Biochem. J.*, **18**, 641-6.
Zilva and Connell (1924): *Biochem. J.*, **18**, 638-40.
Zilva and Kay, H. D. (1923): *Biochem. J.*, **17**, 872-4.

A NEW TITRATION METHOD FOR SUGAR DETERMINATION.

BY

NOBUZOO FUJII AND NANKOO AKUTSU.

(*From the Biochemical Institute of Nippon Medical Collage.*)

(Received for publication, August 31, 1936)

INTRODUCTION.

Among the numerous titration methods for estimating the sugar based upon its reducing power on alkaline copper solution, Benedict's method (1911) and Pavy-Kumagawa-Suto's method (1904) are most convenient and most reliable ones. Although Benedict's method can be conducted under the ordinary atmosphere, and makes the procedure much easier to conduct than that of Pavy-Kumagawa-Suto, its drawback is the uncertainty of the results obtained, unless it is conducted under several precautions. While Pavy-Kumagawa-Suto's method, the intensity of heating is necessarily restricted by the presence of ammonia and the volume of reacting mixture does not change much owing to the definite sugar concentration to be used, Benedict's method is sometimes apt to be overheated and the volume of the mixture changes sometimes within quite a large range. Under these conditions the reducing power of sugar can not remain constant. Furthermore the reoxidation of cuprous sulphocyanate in an open vessel is also to be avoided when the exact result is wanted.

All these unsatisfactory points in the Benedict's method (1911) can be removed by a new modification stated in the following pages.

The Effect of the Volume of Reaction Mixture on the Reducing Power of Sugar.

In the Benedict's method the reaction mixture is heated in a wide porcelain basin over a direct flame. Although the sugar

solution is running in from the burette, the content is apt to be much concentrated. Benedict suggested to add water when the mixture becomes too much concentrated.

As is well known the reducing power of sugar solution is greatly influenced by the concentration of reacting medium and especially that of copper, we proceeded at first to follow the change of titration value under the different degree of evaporation. For the examination, the 20.0 cc. of Benedict's copper solution (so-called the citrate-carbonate-copper solution) and 5 gm. of anhydrous sodium carbonate, with addition of a very small quantity of powdered pumice stone, were heated in a porcelain basin over a free Bunsen flame, until the carbonate was dissolved entirely (the temperature of the mixture was then about 90-93°C) and the titration with pure glucose was conducted under variation of final volumes of the mixture. The result is shown in Table I.

TABLE I.

Titration with pure glucose solution of different concentration.

Glucose solution used were of 1.00, 0.50 and 0.20 gm/dl concentration.

When no evaporation occurs, the final volume should be about 24, 28 and 40 cc. respectively.

Mode of titration	Final volume		Time required to titration	Volume of glucose solution titrated cc.	Concentration of glucose		
	When no evaporation occurs cc.	real cc.			used gm/dl	found gm/dl	% of error
Under free evaporation	24	17	8'34"	3.70	1.00	1.075	+7.5
With constant addition of hot water	24	22	6'42"	3.81	1.00	1.050	+5.0
	24	25	8'18"	3.84	1.00	1.041	+4.1
	28	20	5'03"	7.60	0.50	0.525	+5.0
Under free evaporation	40	22	15'30"	18.55	0.20	0.214	+7.0
	40	29	6'05"	20.08	0.20	0.1992	-0.4
	40	32	8'00"	20.60	0.20	0.194	-3.0

As can be seen from the table the result obtained by Benedict's method depends on the final volume of reaction mix-

ture. If the mixture is too much concentrated, the reducing power of sugar increases, while when the solution is more diluted more sugar is needed. It is therefore desirable to work within the finite range of volume change.

We have therefore tried to perform the titration on heating with steam, by which method the final volume attains almost the same amount so far as we titrate with the sugar solution of the same concentration. The result obtained by this steam heating is shown in Table II.

TABLE II.
Titration on steam heating, with addition of various
amounts of anhydrous sodium carbonate.

Amount of pure anhydrous sodium carbonate, gm	Concentration of glucose solution, gm/dl	Final volume		Temperature of titrating mixture °C	Time required for titration	Amount of glucose solution required		Maximum devia- tion of titrat- ing amount cc.	% of error	Result of estimation gm/dl
		When no evaporation occurs, cc.	real cc.			calcu- lated cc.	found cc.			
5	1.00	24.0	31-33	90-97 -103	6.5'-7.5'	4.00	3.98	0.04	-0.5	1.005
6	1.00	24.0	29-33	90-104	2.3'-4.2'	4.00	4.00	0.02	0.	1.000
5	0.20	40.0	50	90-98	8.6'	20.00	21.95	0.06	+10.	0.182
8	0.20	40.0	51.5	90-99	6.2'	20.00	21.16	0.03	+5.8	0.189
10	0.20	40.0	52.5	90-100	5.7'	20.00	20.74	0.04	+3.7	0.193

As is clear from the table for 1.0 gm/dl pure glucose solution the final volume attains always about 32 cc. and in this case the error of titration always remains under -0.5%. With the 0.20 gm/dl solution, however, the final volume is increased to so much as 50 cc. and the sugar solution needed, is about 10 per cent more to reduce total copper. By increasing alkali concentration by the use of greater amount of anhydrous sodium carbonate, the error of titration becomes less, but still remains about 4 per cent larger.

To overcome this divergency of titration value according to the concentration of sugar solution, we have tried to decrease the amount of copper in the copper solution avoiding thus the dilution

of titration mixture by too dilute sugar solution. At the same time the expense of reagent was also reduced by adapting Benedict's original solution.

On some trials the copper solution mostly suited for the steam heating method was found to be 7.90 gm/l of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Salt content and alkalinity were also modified.

A NEW TITRATION METHOD.

Reagents:

I. New copper solution.

The copper solution newly adapted contains the following chemicals in 1,000.0 cc.

Newly recrystallized pure copper sulphate,

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	7.90 gm.
Pure Rochelle salt	100 gm.
Pure anhydrous sodium carbonate	50 gm.
Pure potassium sulphocyanate	60 gm.
1 gm/dl potassium ferrocyanide solution	12-15 cc.

Method of preparation: Rochelle salt, anhydrous sodium carbonate, and sulphocyanate are dissolved in 600-700 cc. of distilled water in a beaker and the mixture, filtered if necessary, is transferred in a measuring flask of 1.0 liter capacity. 7.90 gm. of pure recrystallized copper sulphate are weighted exactly in a small beaker and added quantitatively into the measuring flask above mentioned, by means of distilled water. 12-15 cc. of ferrocyanide solution are then added and the mixture is filled exactly to the mark with distilled water at room temperature.

20.0 cc. of this blue copper solution correspond to 20.0 mg. of anhydrous pure glucose exactly. Preserved on the laboratory shelf at ordinary temperature no alteration was observed for six months at least.

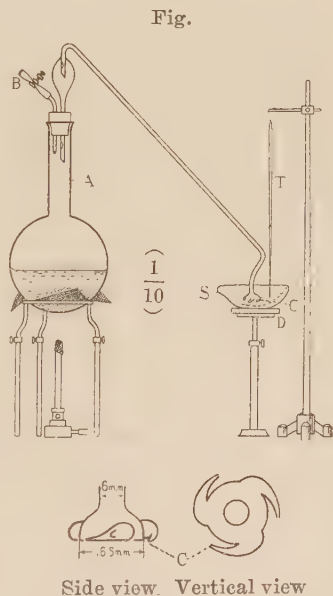
The preparation of this solution is much easier than that of the Benedict's solution and the price of reagent is much reduced.

II. Pure anhydrous sodium carbonate.

Apparatus:

Apparatus consist of steam producer, titrating porcelain basin and thermometer, together with a 10 cc. burette with blue lining containing test solution.

The steam producer (A) is made of a liter round flask half filled with water. The boiling is facilitated by the addition of granulous zinc metal. The flask is heated to boiling with the tubing B open. The flame is corrected to a necessary width and by pinching off B cautiously the current of steam is ejected from C smoothly. Steam is introduced into the reacting mixture in the titrating porcelain basin (S) of 10 cm. diameter through ejecter (C) in a whirling motion. The steaming allows us the well-mixing of the reacting medium. A Thermometer is used to measure the temperature of reacting mixture in the titration.



Procedure:

The titrating basin containing 20.0 cc. of copper reagent is placed on the holder D, and sliding up the latter to a correct height, the steam-ejecter is dipped into the solution nearly to the bottom. A thermometer T is put into the solution. 6-7 gm. of pure anhydrous sodium carbonate are then added. The current of steam is so regulated by adjusting B cautiously, that the reagents can be heated to 90°C within 1.5-2 minutes. When the temperature of reagents reached to 90°C, the sugar solution is added from the burette held in the hand cautiously, avoiding the heating of the burette by the vapour.

The reaction mixture is well stirred by the whirling action of a

steam jet, in this way avoiding bumping and allowing it to heat smoothly.

With the addition of sugar solution, the blue colour of the reagents begins to diminish gently. The titration is carried out until the blue colour of the reagents entirely fades away. After the last drop the heating is continued about one minute more to ascertain the end of the reaction, in which the solution remains entirely colourless.

The most favorable duration of titration was found to be 3.5–6.5 minutes.

After the end of titration, the titration basin is set down, the tip of thermometer T and ejecter C are cleaned with a jet of distilled water to prepare for next titration.

The manipulations of this new titration method seem to be far easier than that of Benedict's, once the current of steam has been regulated.

In case where sugar solution to be determined is scarce in volume or highly coloured, the definite amount of the sugar solution can be put into the reagents and heated for one minute, then titrated further with 0.5–1.0gm/dl glucose solution.

Calculation:

20.0 cc. of new copper reagent correspond to 20.0 mg. of pure anhydrous glucose.

1. When titration is carried out to the end by “a” cc. of sugar solution to be estimated,

$$\frac{20.0}{a} \cdot 100 \text{ mg/dl} = \frac{2.0}{a} \text{ gm/dl} \quad \text{as glucose.}$$

2. When the reagent is reduced by “b” cc. of unknown sugar solution and titrated to the end by “c” cc. of 0.50 gm/dl glucose solution,

$$\frac{1}{b} (2.0 - c \cdot 0.50) = \frac{4.0 - c}{2b} \text{ gm/dl} \quad \text{as glucose.}$$

*The Result obtained by this Method for Sugar Solution
of Different Concentrations.*

In the following the result of determination for sugar solution

of different concentration is shown, indicating that the pure glucose solution differing in concentration between 0.20–1.0 gm/dl can be equally well estimated.

In case of 0.20 gm/dl solution the amount of anhydrous sodium carbonate should be increased to 7 gm. instead of 6 gm. in stronger sugar solution.

TABLE III.

Amount of pure anhydrous sodium carbonate, gm.	Concentration of glucose solution gm/dl	Temperature of titrating mixture °C	Time required for titration	Amount of glucose solution required		Maximum deviation of titrating amount, cc.	% of error
				calculated cc.	found cc.		
6	1.00	90–98–101	2.3'–3.5'	2.00	1.99	0.02	–0.5
6	0.80	90–99–100	2.0'–3.0'	2.50	2.50	0.04	0
6	0.50	90–101–102	2.0'–5.0'	4.00	4.00	0.03	0
6	0.40	90–99	2.5'–3.1'	5.00	5.00	0.01	0
6	0.20	90–101–98	2.2'–4.7'	10.00	10.23	0.20	+2.3
7	0.20	90–98–99	2.2'–2.3'	10.00	10.00	0.03	0

As can be seen from this table the error of this method does not exceed ± 1 per cent.

Considering that in case of the Benedict's method the deviation of result obtained in pure glucose solution differing in concentration between 0.2–1.0 gm/dl varies 5–8 per cent, and even in the titration with the same sugar solution of adequate dilution, the error is still large this new method seems to be recommendable.

The above mentioned method of estimating pure glucose solution may be well applied for the determination of sugar in glycosuric urine. The method is not naturally influenced by the presence of creatinine or uric acid.

SUMMARY.

1. A new direct titration method is described in detail.
2. The heating is effected by the current of steam, which

avoids the overheating and retains the volume of reacting mixture within a certain range. These conditions afford us always the constant titration values for the sugar solution of 0.20–1.0 gm/dl concentration.

3. The preparation of the reagent is easy and the cost is far reduced compared with the Benedict's reagent.

4. The reagent is highly durable.

5. The manipulations of this new titration method seem to be far easier than that of Benedict's once the current of steam has been regulated.

REFERENCES.

Benedict (1907): *J. Biol. Chem.*, **3**, 101.

Benedict (1911): *J. Biol. Chem.*, **9**, 57.

Benedict (1911): *J. Am. Med. Association*, **57**, 1193.

Kumagawa-Suto (1904): *Festschrift f. E. Salkowski*, 211.

UNTERSUCHUNG DER KRÖTENGALLE.

VI. Konstitution der Trioxy-isosterocholensäure.

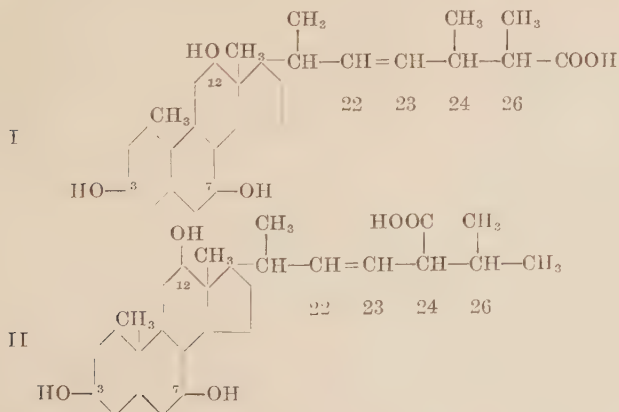
VON

TAYEI SHIMIZU u. TARO KAZUNO.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1936)

In den vorigen Mitteilungen (1934, 1936) haben wir berichtet, dass in der Wintergalle von Kröten, deren Gallenblase individuell ganz verschieden ist und durchschnittlich 0,8 ccm Galle enthält, ausser Trioxybufo-sterocholensäure eine isomere, als Trioxy-isosterocholensäure bezeichnete, ungepaarte Säure von der Formel $C_{28}H_{46}O_5$ vorkommt. Die erstere Säure ist zu ca. 0,1%, die letztere zu ca. 0,04% in der Galle enthalten; die beiden Säuren werden leicht mit Äther direkt aus der Galle extrahiert, da die Galle gegen das Lakmus sauer reagiert. Es wurde von uns bereits (1936) bewiesen, dass die Trioxybufo-sterocholensäure zur Cholsäurereihe gehört, dass ihre 3 Hydroxylgruppen in der Stellung von C_3 , C_7 und $C_{12}(1)$ liegen und mit denen der Cholsäure gleiche räumliche Lage haben, genau wie es bei der Cholsäure der Fall ist, sowie dass ihre Doppelbindung in der δ -Stellung zur Carboxylgruppe der Seitenkette und zwar zwischen $C_{22}-C_{23}(1)$ liegt.



Was die Trioxy-isosterocholensäure betrifft, so wurde bereits von uns (1936) berichtet, dass sie ebenfalls 3 Hydroxylgruppen und eine Doppelbindung in der Seitenkette hat, da sie ein Bromlaktone bilden kann, wie es bei der ersten Säure (1) der Fall ist, dass aber die beiden Säuren voneinander ganz verschieden sind. Einerseits um den strukturellen Unterschied zwischen beiden Säuren festzulegen und andererseits um die Konstitution der Trioxy-isosterocholensäure aufzuklären, haben wir den vorliegenden Versuch vorgenommen.

Um die Stellung der Doppelbindung festzulegen, wurde die Isosterocholensäure rein dargestellt. Ihr Methylester wurde in Eisessig durch Ozon abgebaut. Dabei wurde eine Bis-nor-cholensäure erhalten, die bei 208–210° schmilzt.

Der Mischschmelzpunkt dieser Bis-nor-cholensäure mit der von Herrn Geheimrat Wieland (1926) gelieferten α -Bis-nor-cholensäure aus Cholsäure sowie mit der aus Trioxy-bufo-sterocholensäure dargestellten Bis-nor-cholensäure zeigt keine Depression.

Die Doppelbindung der Trioxy-isosterocholensäure liegt also zwischen C₂₂–C₂₃ (II), und diese Säure gehört ebenfalls der Cholsäurereihe an, genau wie das bei der Trioxy-bufo-sterocholensäure der Fall ist.

Weiter, um die Stellungen der 3 Hydroxylgruppen festzulegen, wurde die Trioxy-isosterocholensäuremethylester in genau gleicher Weise (1936) durch Ozon abgebaut. Dabei wurde eine Bis-nor-cholensäure erhalten, die bei 285–286° schmilzt.

Der Mischschmelzpunkt dieser Bis-nor-cholensäure entweder mit der in gleicher Weise aus Trioxy-bufo-sterocholensäure erhaltenen oder mit der durch stufenweisen Abbau nach Grignard aus Cholsäure erhaltenen Bis-nor-cholensäure zeigt keine Depression. Die 3 Hydroxylgruppen liegen also in der Stellung C₃, C₇ und C₁₂ (II) genau wie es bei der Cholsäure und Trioxy-bufo-sterocholensäure der Fall ist, und ihre räumlichen Lagen erwiesen sich mit denen der Cholsäure als ganz identisch.

Das Grundgerüst und die Stellung der Hydroxylgruppen der Trioxy-isosterocholensäure sind also mit denen der Cholsäure und

der Trioxy-bufo-sterocholensäure ganz identisch. Der Unterschied zwischen den beiden isomeren Sterocholensäuren scheint also darauf zu beruhen, dass die Carboxylgruppe der Seitenketten von Trioxy-bufo-sterocholensäure in der Stellung C₂₆ (I) und die von Trioxy-isosterocholensäure in der Stellung C₂₄ (II) liegen dürfte, indem dadurch die Stellung des asymmetrischen Kohlenstoffes bei beiden Säuren verschieden ist, was eine verschiedene optische Aktivität zur Folge hat.

In der Tat dreht die Bufosterocholensäure (1934) links und ihre isomere Säure, die Isosterocholensäure, (1936) rechts. Diese Annahme wird durch die Bildung von verschiedenen Bromlaktonen unterstützt, indem aus Trioxy-bufo-sterocholensäure ein Bromlaktone (1934) vom Schmelzpunkt 225° und aus ihrer isomeren Trioxy-isosterocholensäure eins (1936) vom Schmelzpunkt 202° geliefert wird. Die Doppelbindung der Trioxy-isosterocholensäure muss also in der γ -Stellung der Carboxylgruppe der Seitenketten (II) liegen. Die Struktur der Seitenkette von C₂₄–C₂₈ der beiden Sterocholensäuren bleibt noch ungeklärt. Die durch Ozon aus den beiden Säuren abgebauten Spaltstücke sind wegen Mangels an Material schwer zu fassen, deshalb ist jetzt ein synthetischer Versuch im Gange.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

I. Bis-nor-cholansäure aus Isosterocholensäuremethylester.

130 mg Ester (Fp 117°) wurden in 10 ccm Eisessig gelöst und 15 Minuten lang mit Ozon durchströmt, wobei sich ein Ozonid abschied. Durch Destillation von Eisessig im Vakuum wurde das wieder in Äther aufgenommen wurde. Diese ätherische Lösung Ozonid mit 10 ccm Wasser versetzt und unter 30 Minuten langem Erwärmen auf dem Wasserbade zerlegt. Nach dem Erkalten wurde die Lösung mit Äther extrahiert und aus dieser ätherischen Lösung die Säure in N/1-Natronlauge aufgenommen, wobei sich das Alkalisalz zum Teil abschied. Aus dieser Lösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure eine Fällung erhalten, die wieder in Äther aufgenommen wurde. Diese ätherische Lösung wurde dann mit Wasser gut gewaschen und mit Natrium-

sulfatanhydrid getrocknet. Daraus wurde ein sirupöses Öl erhalten, welches beim Kochen in Essigäther zum Krystallbrei erstarrte.

Der aus heissem Eisessig und aus Essigsäure umkrystallisierte langgestreckte, flache, glashelle, prismatische Kristall schmilzt bei 208–210°. Ausbeute 4,5 mg. Der Mischschmelzpunkt dieser Säure mit α -Bis-nor-cholansäure (214°) liegt bei 210° und derjenige mit der Bis-nor-cholansäure (207°) aus Bufo-sterocholensäure bei 208°. Die beiden Säuren zeigen also keine Schmelzpunktdepression.

3,794 mg Subst.: 10,960 mg CO₂, 3,720 mg H₂O.

C₂₂H₃₆O₂ Ber. C 79,47 H 10,84

Gef. „ 78,81 „ 10,97

II. Bis-nor-cholsäure aus Trioxy-isosterocholensäuremethylester.

1,01 g Ester (220°) wurden in 20 ccm Chloroform suspendiert und 30 Minuten lang mit Ozon durchströmt, wobei schon nach 20 Minuten der Ester in Lösung ging. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels bei Zimmertemperatur wurde das Ozonid mit 20 ccm Wasser unter 30 Minuten langem Erwärmen auf dem Wasserbade zerlegt.

Nach dem Erkalten wurde die Fällung abfiltriert, die in Essigäther aufgenommen wurde. Aus dieser Essigätherlösung wurde die Säure durch Schütteln mit einer 5%igen Sodalösung ausgezogen. Aus der Lösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure eine Fällung erhalten, die wieder in Essigäther gelöst wurde. Diese Lösung wurde nach dem Waschen mit Wasser mit Natriumsulfatanhydrid getrocknet und vom Essigäther befreit, wobei sich die prismatischen Kristalle abschieden. Die aus Essigäther mehrmals umkrystallisierte Säure schmilzt bei 285–286°. Ausbeute 16 mg. Sie zeigt die Hammarstensche Reaktion. Liebermannsche Reaktion: gelbgrün, orange gelb, dann gelbbraun mit Fluoreszenz. Die Mischprobe dieser Säure mit der Bis-nor-cholsäure (286°) aus Cholsäure und mit der aus Trioxy-bufo-sterocholensäure (284°) zeigt keine Depression.

5,097 mg Subst.: 12,895 mg CO₂, 4,330 mg H₂O.

$C_{22}H_{36}O_5$	Ber. C 69,43	H 9,54
	Gef. „ 69,12	„ 9,52

Anhang: Nor-cholsäure (1936).

Die aus Cholsäure nach Grinard erhaltene krystallwasserfreie Norcholsäure vom Schmelzpunkt $183,5^\circ$ ist sehr hygroskopisch und schwer zu analysieren. Die ganz krystallwasserfreie Säure kann aber lange Zeit durch vorsichtiges Trocknen im Xylolbad bei Hochvakuum erhalten und analysiert werden, wie folgt:

4,618, 4,851 mg Subst.: 11,770, 12,415 mg CO_2 , 4,010,
4,210 mg H_2O .

$C_{23}H_{38}O_5$	Ber. C 69,99	H 9,71
	Gef. „ 69,66, 69,81	„ 9,73, 9,71.

Nor-cholsäuremethylester (1936).

4,795, 5,000 mg Subst.: 12,415, 13,00 mg CO_2 , 4,240,
4,470 mg H_2O .

$C_{24}H_{40}O_5$	Ber. C 70,53	H 9,87
	Gef. „ 70,65, 70,94	„ 9,89, 10,00.

LITERATUR.

- Shimizu, T. u. Oda, T. (1934): Zs. Physiol. Chem., **227**, 74.
 Shimizu, T. u. Kazuno, T. (1936): Ebenda **239**, 67.
 Shimizu, T. u. Kazuno, T. (1936): Ebenda **239**, 74.
 Shimizu, T. u. Kazuno, T. (1936): Ebenda **244**, 167 u. 170.
 Wieland, H., Schlichting, O. u. Jacobi, R. (1926): Zs. Physiol. Chem., **161**, 80.

ÜBER EIN NEUES STERIN (SAPOGENOL) AUS „SHOYU-ÖL“ (I)

VON

TARO KAZUNO.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,
Vorstand: Professor Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1936)

In letzter Zeit wurde durch die eingehenden Untersuchungen von Kitasato(1932–1936), Winterstein(1931–1933), Ruzicka (1936), Walz (1931) und Kuwada (1936) die Konstitution der sauren Sapogeninen bzw. der Oleanolsäure und des Hederagenins weitaus aufgeklärt. Bei der Untersuchung des „Shoyu-öls“ aus Sojabohnen und Weizensamen habe ich aus dem unverseifbaren Anteil ein Steringemisch erhalten, woraus ein neues, als neutrales Sapogenin zu betrachtendes Sterin $C_{30}H_{50}O_3$ gewonnen wurde, welches seiner Zusammensetzung und Eigenschaften nach der Oleanolsäure $C_{30}H_{48}O_3$ sehr ähnlich ist.

Neulich hat auch Nosoe (1934) aus den Samen von „Barringtonia asiatica Kurz“ ein neutrales Poloxy-sapogenin, Barrigenol A_1 u. A_2 von der Zusammensetzung $C_{30}H_{50}O_5$ u. $C_{30}H_{50}O_4$ isoliert, welches fünf Alkoholgruppen enthält.

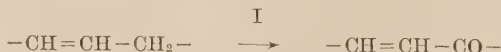
Es ist sehr schwer, die Zusammensetzung dieser hochmolekularen Sapogeninen festzulegen, da ihre Isolierung und Reinigung bekanntlich äusserst schwer sind. Während bereits Izume (1933) im „Shoyu-öl“ aus Sojabohnen und Weizen Ergosterin optisch nachgewiesen und Sumiki(1929–36) und Okano u. Ohara(1933) aus Sojabohnen ein neutrales Sapogenin isoliert haben, sind diese jedoch von meinem Sterin weit verschieden. Ob dieses neue Sterin aus dem „Shoyu-öl“ von Weizensamen oder Sojabohnen selbst herkommen könnte, oder ob es bei der Pilzwirkung auf den genannten Samen in den Pilzzellen gebildet worden sei, kann man jetzt noch nicht entscheiden.

Zuerst muss man die ursprünglichen Materialien genau unter-

suchen. Nach einer brieflichen Nachricht von Herrn Professor Nosoe soll ein Sterin, wie ich es hier beschrieben habe, aus den Sojabohnen selbst isoliert werden.

Der durch Verseifung des "Shoyu-öls" erhaltene unverseifbare Anteil besteht aus einem Gemisch verschiedener Sterine, wie Sitosterin, Ergosterin und neuem Sterin $C_{30}H_{50}O_3$. Aus der in Äther schwerlöslichen Fraktion dieses Steringemisches wurde ein Sterin gewonnen, welches bei gegen 230° schmilzt.

Das über Acetat gereinigte Sterin krystallisiert aus Alkohol in schönen Nadeln und schmilzt bei 258° und hat seine spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{25} = +93,06^\circ$ (nach brieflicher Angabe von Nosoe 254° u. $+99,0^\circ$). Sein Triacetat schmilzt bei $178-179^\circ$ und sein Tribenzoat bei $184-186^\circ$. Aus den Analysendaten des Sterins und seiner Derivate stimmt die Zusammensetzung am besten zu der Formel $C_{30}H_{50}O_3$, wobei natürlich die Formeln $C_{29}H_{48}O_3$ und $C_{31}H_{52}O_3$ nicht ausgeschlossen sind. Bei Liebermannscher Reaktion zeigt das Sterin eine violettrote Farbe und ist bei 3 mm Hg und 300° unverändert destillierbar. Die drei Sauerstoffe des Moleküls $C_{30}H_{50}O_3$ funktionieren also als Alkoholgruppe. Es enthält eine Doppelbindung, die allen Reduktionsmethoden widersteht, da sein Triacetat unter Entfärbung der Bromlösung ein Monobrom-sterinacetat von der Formel $C_{30}H_{48}O_3(CH_3CO)_3Br$, welches sich bei 194° zersetzt, und durch Oxydation mit Chromsäure in der Wärme ein einen Sauerstoff mehr enthaltendes Triacetat $C_{30}H_{48}O_4(CH_3CO)_3$ liefert, welches letzteres den Ketonreagentien hartnäckig widersteht, indem es kein Oxim und kein Semicarbazon gibt. Dieses Triacetat schmilzt bei $265-266^\circ$. Dies weist darauf hin, dass die der Doppelbindung benachbarte Methylengruppe in Carbonylgruppe (I) oxydiert worden ist.



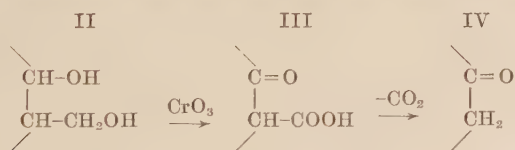
Dieses Monobrom-sterin-acetat wird durch zehnstündige Hydrolyse mit 2% iger alkoholischen Kalilauge nicht entbromt, sondern in ein anderes Monobrom-sterin von der gleichen Zusammensetzung $C_{30}H_{48}O_3Br$ übergeführt, welches sich bei 310° zersetzt, dessen Acetat bei 204° schmilzt. Das Monobrom-sterin-

acetat vom Schmelzpt. 194° wird ebenfalls durch Kochen mit Zinkpulver in Eisessiglösung nicht entbromt, sondern in das Monobromsterin-acetat vom Schmelzpunkt 204° verwandelt.

Ob diese Veränderung des Monobromsterins bei der Hydrolyse mit Kalilauge und beim Kochen mit Zink in der Isomerisierung oder in der Verunreinigung zu suchen sei, lässt sich jetzt noch nicht entscheiden und muss weiter genau verfolgt werden.

Bei der Oxydation mit Chromsäure liefert das Sterin hauptsächlich einen in sechsseitigen Tafeln krystallisierenden neutralen Körper, das Diketon von der Formel $C_{29}H_{44}O_2$ (IV), welches bei 251° schmilzt und ein Dioxim liefert, wobei auch eine in vierseitigen Prismen krystallisierte Monocarbonsäure von der Formel $C_{30}H_{44}O_4$ (III) in geringerer Ausbeute erhalten wurde. Diese Säure schmilzt bei 213° und ihr Methylester bei 174° .

Das Sterin enthält also eine primäre und zwei sekundäre Alkoholgruppen, welche letztere zwei im Ring liegen müssen. Was die Beziehung zwischen den Stellungen der einen sekundären und der primären Alkoholgruppe betrifft, so müssen sie sich in 1,3-Stellung (II) befinden, wie das bei der Oleanolsäure der Fall ist.



Das Sterin wird also durch Oxydation mit Chromsäure unter Abspaltung von Kohlensäure leicht in ein Diketon (II-IV) übergeführt.

Um das Grundgerüst dieses Sterins aufzuklären, wurde das Diketon vom Schmelzpunkt 251° in Eisessig nach Clemmensen reduziert. Dabei wurde ein Kohlenwasserstoff $C_{29}H_{48}$ vom Schmelzpunkt 160° erhalten. Dieser Kohlenwasserstoff stimmt nicht mit dem Dihydro-iso-oleanylen $C_{29}H_{48}$ von Kuwada (1936) und mit dem Oleanen $C_{29}H_{48}$ von Winterstein (1933) überein. Dieser Unterschied zwischen den beiden und meinem Kohlenwasserstoff beruht höchstwahrscheinlich auf der verschiedenen Stellung der Doppelbindung im Molekül.

Ob dieses neue Sterin das gleiche Grundgerüst wie Cholesterin, Gallensäure, Hederagenin und Oleanolsäure besitzt, muss weiter mittelst der Dehydrierung genau untersucht werden.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

1. *Sapogenol* $C_{30}H_{50}O_3$.

1 kg "Shoyu-öl" wurde mit 1 Liter einer 20%igen alkoholischen Kalilauge 5 Stunden lang hydrolysiert und das Hydrolysat nach Abdampfen des Alkohols mittelst Äther mehrmals extrahiert. Dabei wurden 5 g eines in Äther löslichen Steringemisches erhalten, welches sich nach dem Trocknen mit wasserfreiem Äther in verschiedene Fraktionen teilte.

Aus dem in Äther schwerlöslichen Teil wurde ein sandiges, gelbes Pulver gewonnen, das bei gegen 230° schmilzt. Dieses Pulver wurde mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat 5 Stunden lang gekocht. Nach dem Erkalten wurde das Reaktionsgemisch in Eiswasser eingegossen und die dabei abgeschiedene Masse aus Alkohol umkrystallisiert. Der Krystall schmilzt bei 180° . Die Masse wurde mit 2%iger alkoholischer Kalilauge anderthalb Stunden hydrolysiert. Die durch Eingießen des Hydrolysates in Wasser abgeschiedene Masse wurde mehrmals aus Alkohol umkrystallisiert. Dabei wurde ein Nadelkrystall erhalten, der bei 258° schmilzt. Die Ausbeute betrug 0,08%.

4,882, 4,018 mg Subst.: 14,055, 11,550 mg CO_2 , 4,810, 3,920 mg H_2O .

$C_{30}H_{48}O_3$ Ber. C 78,312 H 10,89

$C_{30}H_{50}O_3$ „ „ 78,534 „ 10,99

$C_{31}H_{52}O_3$ „ „ 78,740 „ 11,10

Gef. „ 78,67, 78,50 „ 11,04, 10,93.

Nach Rast: 0,207 mg in 3,807 mg Kampher $5,3^\circ$.

0,263 „ „ 2,460 „ „ 10,3°.

$C_{30}H_{50}O_3$ Ber. 458,4

Gef. 404,0, 415,0.

Spez. Drehung: 0,0505 g Subst. in 10 cem Chloroform,

$l = 2$ dm, $\alpha = +0.94$:

$[\alpha]_D^{21} = +93,06^\circ$.

Dieses neue Sterin wurde bei 3 mm Hg und bei 300° der trocknen Destillation unterworfen, bei der es bei 250 – 270° schmilzt

und bei 300° vollständig destilliert wird und erstarrt. Diese Masse krystallisiert aus Alkohol in Nadeln und schmilzt ebenfalls bei 258°.

Der Mischschmelzpunkt dieses Krystalls mit dem ursprünglichen Sterin zeigt keine Depression. Bei Liebermannscher Reaktion zeigt es anfangs eine rosarote, dann violettrote Farbe, wobei sich die Chloroformschicht nicht färbt. Dies erinnert mehr an Gallensäure als an Sterine. Bei der Salkowskischen Reaktion zeigt es anfangs eine braunrote dann rote Farbe. Dieses Sterin löst sich leicht in Chloroform und Alkohol, schwer in Äther und gar nicht in Wasser. Es liefert mit Hydroxylamin kein Oxim und mit Semicarbazid kein Semicarbazon.

Sterinacetat:

0,1 g Sterin wurde mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat auf dem Wasserbade 5 Stunden lang gekocht und das Reaktionsgemisch in eine Menge Wasser eingegossen. Die dabei abgeschiedene Fällung wurde abfiltriert und aus Alkohol mehrmals umkrystallisiert. Das in Tafeln krystallisierte Acetat schmilzt bei 178–179°. Es löst sich in den meisten organischen Lösungsmitteln. Liebermannsche Reaktion: Violett—orange gelb.

4,708, 5,120 mg Subst.:	12,705, 13,885 mg CO ₂ ,	4,020, 4,290 mg H ₂ O.
$C_{30}H_{47}O_3(CH_3CO)_3$	Ber. C 73,91	H 9,65
	Gef. „ 73,77, 74,05	„ 9,58, 9,37.

Das aus diesem Acetat durch Hydrolyse mit 2%iger alkoholischer Kalilauge regenerierte und aus Alkohol mehrmals umkrystallisierte Sterin schmilzt bei 258°. Das durch wiederholtes Acetylieren mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat erhaltene Acetat schmilzt ebenfalls bei 178–179°. Das erhaltene Sterin ist also ganz rein.

4,457, 4,688 mg Subst.:	12,040, 12,635 mg CO ₂ ,	3,800, 3,930 mg H ₂ O.
$C_{30}H_{47}O_3(CH_3CO)_3$	Ber. C 73,91	H 9,65
	Gef. „ 73,70, 73,54	„ 9,54, 9,38.

Spec. Drehung: 0,0703 g Subst. in 10 ccm Alkohol, $l = 2$ dm, $\alpha = +1,1$
 $[\alpha]_D^{20} = +78,23^\circ$.

Sterin-benzoat:

0,1 g Sterin wurde in Pyridin mit Benzoylchlorid benzyliert. Das dabei abgeschiedene Benzoat krystallisiert aus Alkohol in

Nadeln und schmilzt bei 184–186°.

4,582, 4,394 mg Subst.:	13,310, 12,765 mg CO ₂ ,	3,340, 3,180 mg H ₂ O.
$C_{30}H_{47}O_3(C_6H_5CO)_3$	Ber. C 79,29	H 8,11
	Gef. „ 79,25, 79,25	„ 8,16, 8,10.

2. Bromierung des Sterinacetates.

(i) Monobrom-Sterin-acetat von 194°:

0,35 g Sterinacetat vom Schmelzpunkt 178–179° wurden in 6 ccm Eisessig gelöst und mit einer Bromeisessiglösung (100 ccm Eisessig u. 10g Brom) titriert, wovon 1,7 ccm verbraucht wurde. Die durch Eingiessen der Reaktionslösung in viel Wasser abgeschiedene Fällung wurde aus Alkohol umkrystallisiert. Das in prismatischen Nadeln krystallisierte Bromsterin zersetzt sich bei 194°.

4,548, 4,860 mg Subst.:	10,815, 11,590 mg CO ₂ ,	3,420, 3,670 mg H ₂ O
2,979, 3,578 mg Subst.:	0,359, 0,432 mg AgBr.	
$C_{30}H_{45}O_3(CH_3CO)_3Br$		
Ber. C 64,92	H 8,63	Br 12,01
Gef. „ 64,85, 65,05	„ 8,41, 8,45	„ 12,08, 12,07.

(ii) Monobrom-sterin-acetat von 204°:

0,1 g Monobrom-sterin-acetat (194°) wurden in 20 ccm Eisessig gelöst und mit 2 g Zinkpulver auf dem Sandbad 10 Stunden lang gekocht und vom Zink abfiltriert. Dieses Filtrat wurde in viel Wasser eingegossen und die dabei abgeschiedene Fällung aus Alkohol umkrystallisiert. Das in Nadeln krystallisierte Acetat schmilzt bei 204°. Es hat eine mit dem vom Schmelzpunkt 194° gleiche Zusammensetzung, ist aber sonst davon verschieden.

4,541 mg Subst.:	10,785 mg CO ₂ ,	3,245 mg H ₂ O.
10,842 mg Subst.:	3,082 mg AgBr.	
$C_{30}H_{45}O_3(CH_3CO)_3Br$	Ber. C 64,92	H 8,63 Br 12,01
	Gef. „ 64,80	„ 8,00 „ 12,00.

Monobrom-Sterin:

0,5 g Monobrom-sterin-acetat von 194° wurden in 50 ccm einer 3%igen alkoholischen Kalilauge auf dem Wasserbade 6 Stunden lang hydrolysiert. Die Lösung wurde in viel Wasser eingegossen

und die dabei abgeschiedene Fällung wurde aus Alkohol umkrystallisiert. Dabei wurde ein sechseckiger Blättchenkrystall erhalten, der sich bei 310° zersetzt. Durch Hydrolyse hat eine Entbrommung des Monobrom-sterin-acetats nicht stattgefunden.

4,538, 4,351 mg Subst.: 11,080, 10,615 mg CO_2 , 3,750, 3,510 mg H_2O .

4,050 mg Subst.: 1,390 mg AgBr.

$\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_3\text{Br}$	Ber. C 66,75	H 9,53	Br 14,81
	Gef. „ 66,64, 66,55	„ 9,25, 9,03	„ 14,56.

50 mg Monobrom-sterin-acetat wurden in 20 ccm einer 3%igen alkoholischen Kalilauge $5\frac{1}{2}$ Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Aus dem Hydrolysat wurde ebenfalls ein in sechseckigen Blättchen krystallisiertes Monobrom-sterin erhalten, das sich bei 310° zersetzt. Der Mischschmelzpunkt dieses Monobrom-sterins mit dem aus Monobrom-sterin-acetat vom Schmelzpunkt 194° erhaltenen zeigt keine Depression. Das Monobrom-sterin wurde in üblicher Weise mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat acetyliert, wobei ein Monobrom-sterin-acetat vom Schmelzpunkt 204° gewonnen wurde. Sowohl aus dem Monobrom-sterin-acetat vom Schmelzpunkt 194° , als auch aus dem vom Schmelzpunkt 204° wird durch Hydrolyse dasselbe Monobrom-sterin gewonnen, welches durch Acetylieren in das Monobrom-sterin-acetat vom Schmelzpunkt 204° übergeführt wird, nicht aber in das vom Schmelzpunkt 194° .

3. Oxydation von Sterin.

Monoketo-sterin-acetat:

1 g Sterinacetat wurde in 25 ccm Eisessig gelöst und unter Zusatz von 1,5 ccm einer 10%igen Chromsäure-eisessiglösung bei 70° eine Stunde oxydiert. Das Reaktionsgemisch wurde in viel schwefligesäurehaltiges Wasser eingegossen.

Der dabei ausgefällte Niederschlag wurde abgesaugt und aus Alkohol mehrmals umkrystallisiert. Er krystallisiert in Blättchen und schmilzt bei $265\text{--}266^{\circ}$. Die Ausbeute betrug 0,1 g. Dieses Oxydationsprodukt enthält ein Atom mehr Sauerstoff als das ursprüngliche Sterinacetat, liefert aber weder Oxim noch Semicarbazon. Somit kommt man zu der Annahme, dass durch Oxydation eine Ketongruppe in derartiger Stellung entstanden ist.

dass sie durch die Ketonreagentien nicht nachgewiesen werden können.

4,888 mg Subst.: 12,840 mg CO₂, 4,030 mg H₂O.

C₃₀H₄₈O₄(CH₃CO)₃ Ber. C 72,19 H 9,10

Gef. „ 71,90 „ 9,16.

Diketon und Diketon-monocarbonsäure aus Sterin.

(i) *Diketon:*

2,8 g Sterin wurden in 80 ccm Eisessig gelöst und unter Zusatz einer 5%igen Chromsäure-eisessiglösung bei Zimmertemperatur stehen gelassen, die Lösung in eine grosse Menge Wasser eingegossen und die Fällung abfiltriert. Diese Fällung wurde in 5%iger Sodalösung bei ca 50° digeriert und abfiltriert. Aus der sodaunlöslichen Fraktion wurde ein neutraler Körper erhalten, welcher aus Alkohol in sechseitigen Tafeln krystallisiert und bei 250–251° schmilzt. Die Ausbeute betrug 0,4 g.

4,273, 5,021 mg Subst.: 12,750, 14,950 mg CO₂, 3,905, 4,695 mg H₂O.

C₂₀H₄₄O₂ Ber. C 82,000 H 10,37

Gef. „ 81,40, 81,20 „ 10,45, 10,07.

Das Oxim dieses neutralen Körpers wurde in üblicher Weise in Alkohol mit Hydroxylamin und Natrium-acetat bereitet. Das aus Alkohol in Nadeln krystallisierte Oxim schmilzt bei 265–267°.

2,350 mg Subst.: 0,127 cm N, 25°, 760 mm.

C₂₀H₄₄(NOH)₂ Ber. N 6,16

Gef. „ 6,19.

Aus der sodalöslichen Fraktion wurde eine Säure erhalten, indem die Sodalösung in kaltem Zustand durch Ansäuerung mit Essigsäure ausgefällt wurde. Der aus Methanol umkrystallisierte vierseitige prismatische Krystall schmilzt bei 213°. Die Ausbeute betrug 20 mg. Diese Säure wurde in üblicher Weise mit Diazomethan methyliert. Der Ester krystallisiert aus Methanol in Blättchen und schmilzt bei 174°. Die Ausbeute beträgt 1% der Theorie.

1,810 mg Subst.: 5,110 mg CO₂, 1,550 mg H₂O.

C₃₁H₄₆O₄ Ber. C 77,17 H 9,54

Gef. „ 77,01 „ 9,46

4. *Clemmensen'sche Reduktion des Diketons:*

0,2 g Diketon vom Schmelzpunkt 250–251° wurden in 30 ccm Eisessig mit frisch vorbereitetem amalgamiertem Zink (Zinkblättchen von 8 g) unter allmählichem Zusatz eines Gemisches von 60 ccm Eisessig und 50 ccm konzentrierter Salzsäure 10 Stunden lang auf dem Sandbad erwärmt.

Bei starker Verdünnung der vom Zink abfiltrierten Lösung mit Wasser schied sich eine Fällung ab, die in Äther aufgenommen wurde. Aus dem Äther-Alkoholgemisch wurde ein dicker Tafelkrystall erhalten, der bei 160° schmilzt. Der Krystall löst sich leicht in Äther, aber schwer in Alkohol. Er zeigt keine Liebermann'sche Reaktion.

4,077, 3,004 mg Subst.: · 13,040, 9,600 mg CO₂, 4,330, 3,250 mg H₂O.

C₂₅H₄₈ Ber. C 87,79 H 12,12

Gef. „ 87,25, 87,20 „ 11,80, 12,10.

LITERATUR.

- Izume, S., Yoshimaru, Y. u. Hitaka, T. (1933): Jl. of Agrical. Chem. Soc. Jap., **9**, 246.
 Kitasato, Z. (1932–1936): Acta Phytochemica **6**, 179, 223 u. 305, **7**, 1 u. 169, **8**, 1, 207, 255 u. 315, **9**, 43, 65 u. 75.
 Kuwada, S. (1936): Jl. of Pharmaz. Soc. Jap., **56**, 469.
 Nozoe, T. u. Kinukasa, T. (1935): Jl. of Chem. Soc. Jap., **56**, 864.
 „ u. Katura, S. (1936): „ **57** 692.
 Okano, K. u. Ohara, I. (1933): Jl. of Agrical. Chem. Soc. Jap., **9**, 1249.
 Ruzicka u. Mitarbeiter (1936): Helv. Chim. Acta, **19**, 109, 1136 u. 1391.
 Sumiki, Y. (1929): Jl. of Agrical. Chem. Soc. Jap., **5**, 737.
 Sumiki, Y. (1930): Jl. of Agrical. Chem. Soc. Jap., **6**, 783.
 Winterstein, A. u. Stein, G. (1931): Zs. Physiol. Chem., **202**, 222.
 Winterstein, A. u. Stein, G. (1933): Ann. d. Chem., **502**, 223.
 Walz, E. (1931): Ann. d. Chem., **489**, 118.

STUDIEN ÜBER DIE KONSTITUTION DES OCTOPINS, EINES STICKSTOFFHALTIGEN KÖRPERS IN DEN OCTOPODENMUSKELN.

I. Mitteilung: Eigenschaften und Abbau des Octopins.

VON

SYŪZO AKASI.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Kyōto.
Vorstand: Prof. Dr. K. Mayeda.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1936)

Im vorigen Jahre ist eine Mitteilung von K. Morizawa (1929) aus diesem Institut erschienen, in der er über seine sich auf die Extraktivstoffe der Octopodenmuskeln beziehenden Versuche berichtet und eine ganz neue, von ihm Octopin genannte Base angibt, welche er anstatt des Arginins aus der Argininfraktion als Pikrat isolierte. Das Pikrat hatte die Zusammensetzung $C_9H_{18}N_4O_4 \cdot C_6H_3N_3O_7$, kristallisierte in langen, gelben Nadeln und schmolz bei 225° .

Im Anschluss daran untersuchte A. Matsumoto (1928) die Extraktionstoffe von Surume-Ika (*Annamastrefes* sp.) und fand dabei ein Pikrat vom Schmelzp. 225° , dessen Analysenwerte mit denen des Octopins nicht gut übereinstimmten. Eine ähnliche Angabe machten schon früher U. Suzuki und seine Mitarbeiter (1909) bei ihrer Untersuchung über die Extraktivstoffe des Fischfleisches, dass sie nämlich aus dem Silberbarytniederschlag des Extraktes von Surume-Ika das salzsaure Salz einer unbekannten Base isoliert hätten. Doch teilten sie über die Natur dieser Base nichts Näheres mit. Weiter hat S. Ishibashi (Arbeit noch nicht veröffentlicht) das Octopin noch in den Muskeln von Tintenfischen, einer Klasse der Mollusken, festgestellt. H. Mayeda (1936) fand bei seiner Untersuchung, die sich der von S. Ishibashi anschloss, das Octopin im Schliessmuskel der Kammuschel (*Pecten yessoensis*). Auf Grund all dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass die Muskeln der Kopf-

*füssler einen als Pikrat leicht fassbaren, unbekannten Körper beherbergen. Kutscher, Ackermann und ihre Mitarbeiter haben sich schon seit langem mit vergleichend-physiologischen Untersuchungen der Extrakte verschiedener Tierklassen beschäftigt und sind auf Grund einer ganzen Reihe von Versuchsergebnissen zu der Anschauung gekommen, dass man vom chemischen Standpunkt aus eine systematische Einteilung der Tierwelt durchführen könne (1927), was in der Biochemie zweifellos von grundlegender Bedeutung ist. Diese Forscher stellten fest, dass sich das Kreatin bzw. Kreatinin in seinem Vorkommen auf die Wirbeltiere beschränkt und die Base in der Reihe der Avertebraten mit einigen Ausnahmen durch das noch etwas grössere Guanidinderivat Arginin ersetzt ist. In neuerer Zeit wurden die dem Arginin nahverwandten Verbindungen Arcain aus *Arca noae* (1931) und Citrullin aus *Citrullus vulgaris* (1930) jede für sich zum Gegenstand der Strukturforschung gemacht, wobei man beide zwecks Bestätigung der mutmasslichen Formel synthetisch darstellte. So dürfte es auch nicht bedeutungslos sein, die chemische Struktur des Octopins festzustellen.

So hat der Verfasser auf Veranlassung von Herrn Prof. Dr. Mayeda versucht, die Konstitution des Octopins zu ermitteln, und zwar durch Abbauprobieren.

Das Versuchsmaterial verschaffte sich der Verfasser in derselben Weise wie Morizawa. Aus 100 kg Octopodenmuskeln liessen sich beinahe 70 g gut kristallisierten Octopinpikrats isolieren das in seinem Schmelzpunkt sowie seiner Zusammensetzung mit dem früher angegebenen völlig übereinstimmte (Fig. 1). Das Pikrat lieferte nach dem Entfernen der Pikrinsäure 36 g freie Base, wonach der Octopingehalt der Octopodenmuskeln ca. 0,036% beträgt.

Es sei hier in diesem Zusammenhange erwähnt, dass bei der Isolierung des Octopins aus der Argininfraktion nicht etwa dasselbe allein, sondern ausser ihm eine kleine Menge Arginin in einem Gemisch der *d*- und *dl*-Form isoliert wurde, welcher letzterer Befund aber beim früheren Versuche übersehen worden war. Es zeigte sich also, dass in der Muskulatur der Kopffüßler das Octopin das Arginin nicht vertritt, sondern dass das erstere weitaus vorwiegt und annähernd mindestens das Zehnfache des letzteren beträgt.

Über das genauere Mengenverhältnis später Näheres.

Das freie Octopin.

Das freie Octopin kristallisiert in farblosen, feinen Nadeln (Fig 2) und schmilzt bei 281–282° (unkorr.) unter stürmischem Aufschäumen. Die Elementaranalyse sowie die Molekulargewichtsbestimmung führten zur Aufstellung der Formel $C_9H_{18}N_4O_4$, die mit der vom Pikrat her erwarteten übereinstimmt. Es ist geruch- und geschmacklos und löst sich in heissem Wasser sehr leicht, in kaltem jedoch schwerer (bei 20° in 38 Tln. Wasser), in organischen Lösungsmitteln, wie Methyl-, Äthylalkohol oder Äther, kaum oder gar nicht. Die wässrige Lösung reagiert neutral oder äusserst schwach sauer gegen Lackmus und dreht das polarisierte Licht nach rechts. Das spezifische Drehungsvermögen im Wasser beträgt $[\alpha]_D^{17} = +20,94^\circ$.

Salze und Derivate.

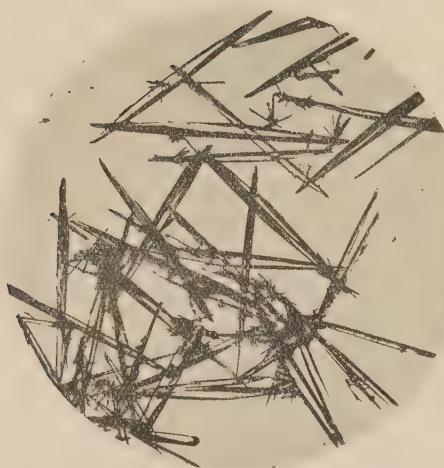
Pikrat: Octopin bildet ein Monopikrat von der Formel $C_{19}H_{18}N_4O_4 \cdot C_6H_3N_3O_7$, das einen Schmelzpunkt von 225° besitzt. Vom Argininpikrat unterscheidet sich dasselbe deutlich durch seine Löslichkeit, seine Kristallform und sein Verhalten gegen Reagenzpapier. Es löst sich in Wasser bedeutend schwerer als Argininpikrat (bei 22° in 461 Tln. Wasser) und kristallisiert leicht ohne Neigung zur Übersättigung oder Ölbildung, welche öfters bei Arginin anzutreffen ist, in langen, gelben, derben Nadeln oder Prismen, welche eigenartig an einem oder beiden Enden spiessartig zugespitzt sind (vgl. Fig. 1). Es reagiert sauer nicht nur gegen Lackmus, sondern auch gegen Kongorot, während Argininmonopikrat dies nur gegen Lackmus, nicht aber gegen Kongorot tut.

Flavianat: $C_9H_{18}N_4O_4 \cdot C_{10}H_6N_2O_8S$. Orangegelbe Nadeln. Es löst sich in 100 ccm Wasser bei 16° zu 0,0263 g, ist daher etwas leichter löslich als Argininflavianat.

Kupfernitratdoppelsalz: $(C_9H_{18}N_4O_4) (Cu(NO_3)_2 + 2H_2O)$.
Schöne hellblaue kleine Prismen vom Schmelzpunkt 247°.

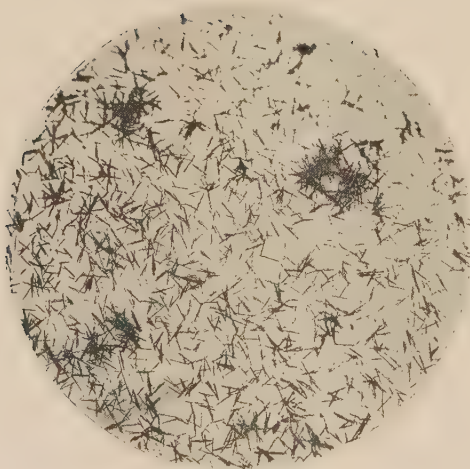
Mit Mineralsäuren bildet das Octopin zwar Salze, spaltet aber durch Reinigung mit Wasser sehr leicht die gebundene Säure ab.

Fig. 1.



Naturoctopinpikrat.
($\times 100$)

Fig. 2.



Naturoctopin.
($\times 100$)

wobei die freie Base in reiner Form zurückbleibt. Beim Zusatz eines grösseren Überschusses von Säure löst es sich sehr leicht darin und scheidet keine kristallinische Masse ab.

Das Octopin bildet keinen Methyl- oder Äthylester, auch kein Benzoyl- oder Acetylderivat.

Farbenreaktionen.

An positiven Farbenreaktionen ist hier besonders die intensive Sakaguchische Reaktion zu nennen, ferner die Pyrrolreaktion. Die Jaffésche Reaktion, die Ninhydrinreaktion und die β -Naphthochinonsulfonsäure-Reaktion verlaufen aber alle negativ, ebenso die sonstigen Farbenreaktionen, welche die Abkömmlinge von Eiweissstoffen aufweisen.

Fällungsreaktionen.

Es erfolgte keine Fällung durch Kaliumquecksilberjodid, Kaliumwismutjodid, Kaliumcadmiumjodid, Gerbsäure, molybdän-saures Ammonium und Baryt, wohl aber durch Phosphorwolfram-säure, Silbernitrat und Baryt, Silbernitrat und Ammoniak sowie Sublimat und Baryt.

Mittels der van Slykeschen Methode ist keine Stickstoffentwicklung nachweisbar. Weder ist eine Methylimid- noch eine Methoxylgruppe vorhanden. Das Ausbleiben der sofortigen Entfärbung der Permanganatlösung beweist das Fehlen der Doppelbindung.

Zum Vergleiche der Eigenschaften des Octopins mit denen des Arginins habe ich beide in der folgenden Tabelle einander gegenübergestellt.

Vergleichstabelle von Octopin und Arginin.

Formel	Octopin $C_9H_{15}N_4O_4$	Arginin $C_6H_{14}N_4O_2$
Sakaguchische Reaktion	(+)	(+)
Ninhydrinreaktion	(-)	(+)
β -Naphthochinonsulfonsäure-Reaktion	(-)	(+)
Jaffésche Reaktion	(-)	(-)
Pyrrolreaktion	(+)	(+)

Aminostickstoff nach van Slyke	fehlt	vorhanden
Methylimid- und Methoxylgruppe	fehlt	fehlt
Reaktion der freien Substanz gegen Reagenzpapier	neutral oder sehr schwach sauer gegen Lackmus	deutlich alkalisch
Reaktion des Pikrats gegen Reagenzpapier	sauer gegen Lackmus sowie Kongorot	nur gegen Lackmus sauer, nicht aber gegen Kongorot
Kupfernitratdoppelsalz	wird gebildet	wird gebildet

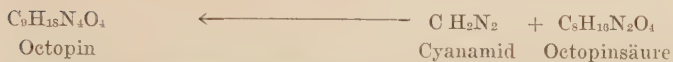
Ein Überblick über diese Vergleichstabelle legte die Vermutung nahe, dass zwischen Octopin und Arginin eine mehr oder weniger grosse Analogie der Konstitution bestehen muss, und in der Tat zeigten die folgenden Abbauversuche die Richtigkeit derselben.

Gegen die Mineralsäuren besitzt das Octopin eine grosse Widerstandsfähigkeit, was daraus hervorging, dass es mit konzentrierter Salzsäure längere Zeit im siedenden Wasserbad erhitzt werden konnte, ohne sich dabei wesentlich zu verändern.

Wurde dagegen das Octopin mit Alkalien, z.B. Barytwasser, auf freier Flamme gelinder gekocht, so zersetzte es sich leicht unter Entwicklung von Ammoniakgas, und aus den Zersetzungsprodukten liess sich ausser Harnstoff noch eine neue Substanz, welche infolge ihres deutlichen sauren Charakters vorläufig Octopinsäure genannt sei, als farblose feine Nadeln isolieren. Diese Säure, über deren Kupfersalz gereinigt, hatte die Formel $C_8H_{16}N_2O_4$ und schmolz bei $270-271^\circ$ (unkorr.) unter Aufschäumen und Bräunung.

Es fragt sich nun, ob das Octopin wirklich durch Einwirkung von Alkalien in Harnstoff und Octopinsäure zerlegt werden kann, analog wie das Arginin in derselben Weise in Harnstoff und Ornithin gespalten wird. Um hierüber Gewissheit zu erhalten, wurde der Cyanamidadditionsversuch durchgeführt, bei dem sich ergab, dass sich das Octopin aus Cyanamid und Octopinsäure synthetisch darstellen lässt. Daraus geht hervor, dass das Octopin unter Aufnahme von 1 Mol Wasser in Harnstoff und Octopinsäure spaltbar ist, was sich durch folgendes Schema ausdrücken lässt.





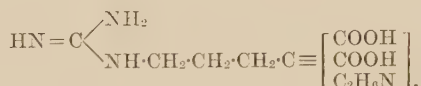
Dass die Octopinsäure zwei Carboxylgruppen trägt, wurde wie folgt sicher gestellt. Zunächst wurde ihr Kupfersalz analysiert und aus dem Kupfergehalt die bezügliche Carboxylgruppe errechnet. Weiterhin verhielt sich die Octopinsäure bei der Titration mit Alkalilauge und vor allem beim Gebrauch von Thymolphthalein als Indikator in wässriger Lösung als Monocarbonsäure, in 75%iger alkoholischer Lösung sowie auch nach der Formolmethode als Dicarbonsäure. Ferner liess sich das Monobenzoylderivat der Säure sowohl in wässriger als auch in 50%iger alkoholischer Lösung als Dicarbonsäure titrieren.

In Bezug auf die zwei Atome Stickstoff, die sich in einem Octopinmolekül vorfinden, wurde das eine mit Hilfe der van Slykeschen Methode als freie Aminogruppe ermittelt. Dass diese Aminogruppe zur Carboxylgruppe eine α -Stellung im Sinne von α -Aminosäure einnimmt, war aber aus dem Grunde auszuschliessen, dass die Entwicklung von Stickstoffgas bei der Reaktion mit salpetriger Säure nur langsam vor sich ging und fernerhin die Ninhydrinreaktion bei ihr negative ausfiel. Was das andere Atom Stickstoff, das mittels der van Slykeschen Methode nicht nachweisbar war, anlangt, so liess sich nicht entscheiden, ob es in einer offenen Kohlenstoffkette durch irgendeine Atomgruppe bedeckt vorliegt, oder ob es an der Bildung eines Atomringes teilnimmt. Doch ist durch die obigen Versuchsergebnisse so viel klar gestellt, dass die Octopinsäure als Dicarbonsäure mit einer freien Aminogruppe aufzufassen ist.

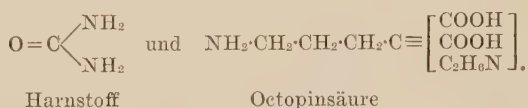
Erwähnt sei ferner das Verhalten von Octopin Oxydationsmitteln gegenüber. Wurde das Octopin in wässriger Lösung mit Bariumpermanganat bei Zimmertemperatur oxydiert, so lieferte es Guanidin und γ -Guanidinbuttersäure als Oxydationsprodukte, beides Körper, die, wie man aus der Literatur ersieht, schon früher Kutscher und Benech bei der Oxydation des Arginins nebst Bernsteinsäure gewonnen haben (1901.)

Alle die obigen Versuchsergebnisse legen den Schluss nahe, dass das Octopin eine dem Guanidinderivat zugehörige Dicarbon-

säure ist, deren Struktur das nachstehende Formelbild besitzen dürfte:



Durch Alkalien wird der Guanidinkern gespalten, wodurch es zur Bildung von Harnstoff und Octopinsäure kommt nach der Formel:



Unter $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$, das in den obigen Formen eingeklammert ist, versteht man die Atomreste des Octopin- bzw. Octopinsäuremoleküls, deren Natur noch unklar ist. Dass es sich dabei aber um keine Methoxyl- oder Äthoxylgruppe handelt, geht daraus klar hervor, dass das Octopin, wie eingangs erwähnt, auf das Vorhandensein dieser Gruppe hin vergebens untersucht wurde. Diesen verhältnismässig kleinen Bruchteil des Octopinmoleküls durch alleinige Abbaumethode klarzustellen, um weiter näher in die Konstitution desselben einzudringen, dürfte mit grösseren Schwierigkeiten verbunden sein. Dazu kommt noch, dass man zum Abbau in erster Linie einer sehr grossen Menge kostbaren Ausgangsmaterials bedarf, was mir aber nicht mehr zur Verfügung stand. Ich versuchte daher, durch Synthese schneller als durch Aufspaltungsversuche ans Ziel zu gelangen. Über die Ergebnisse der synthetischen Versuche bringt die zweite Mitteilung Eingehendes.

EXPERIMENTELLER THEIL.

Materialgewinnung.

Das Untersuchungsmaterial wurde in der Winterzeit, wo eine für das Vorarbeiten günstige Kälte herrschte, gesammelt.

100 kg Octopodenmuskeln, welche von den Eingeweiden getrennt und in der Hackmaschine zerkleinert worden waren,

wurden mit viel Wasser in der Siedehitze zweimal extrahiert. Dem vereinigten abgekühlten Wasserauszuge wurde zunächst 20%ige Tanninlösung im Überschuss zugesetzt und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde mit so viel warmem gesättigtem Barytwasser versetzt, bis ein rötlicher Schaum entstand. Die von dem voluminösen Niederschlag des Bariumtannats abfiltrierte Flüssigkeit wurde mit Schwefelsäure vom Barium befreit. Darauf wurden die Schwefelsäure und die Reste des Tannins durch frisch gefälltes Bleioxyd entfernt, das gelöste Bleioxyd durch Schwefelwasserstoff beseitigt und alles unter vermindertem Druck bei 40° eingengt, wobei sich Taurin reichlich kristallinisch ausschied. Die von der Hauptmasse des Taurins abfiltrierte Flüssigkeit wurde mit Schwefelsäure bis zum Gehalt von 5% versetzt, worauf mit 30%iger Phosphorwolframsäurelösung ausgefällt wurde. Der Niederschlag wurde nach dem Auswaschen mit 5%iger Schwefelsäure durch Baryt zerlegt und dieser durch Kohlensäure entfernt. Die Lösung wurde nun zum Ausfällen der Purinbasen mit verdünnter Salpetersäure schwach angesäuert und mit 20%iger Silbernitratlösung versetzt. Dem Filtrat der Purinsilberverbindung wurde 20%ige Silbernitratlösung so lange zugesetzt, bis eine Probe mit Barytwasser neben weisser Silberverbindung auch braunes Silberoxyd ausfallen liess. Darauf wurde die Flüssigkeit mit Ätzbaryt gesättigt, der erhaltene Niederschlag abfiltriert und mit verdünntem Barytwasser bis salpetersäurefrei ausgewaschen. Der Niederschlag wurde dann mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die vom Silbersulfid abfiltrierte Flüssigkeit im Vakuum eingengt und mit Pikrinsäure, in heissem Wasser gelöst, bis zu kongorotsauer versetzt. Das nach einigem Stehen entstandene Pikrat wurde abgenutscht und einigemal aus heissem Wasser umkristallisiert. Die Kristalle stellten spiessartig zugespitzte Nadeln dar, und schmolzen bei 225° (unkorr.).

2,859 mg Substanz gaben 3,945 mg CO₂ und 1,189 mg H₂O.

3,910 mg Substanz gaben 0,692 ccm N (17°, 759 mm).

Für C₉H₁₈N₄O₄ · C₆H₃N₃O₇

Ber.	C	37,87%	H	4,45%	N	20,63%
------	---	--------	---	-------	---	--------

Gef.	„	37,64	„	4,65	„	20,80
------	---	-------	---	------	---	-------

Freies Octopin.

Zur Gewinnung des freien Octopins wurde das Pikrat in siedendem Wasser aufgelöst, mit Schwefelsäure im Überschuss versetzt und abgekühlt. Die dabei ausgeschiedene Pikrinsäure wurde abgenutscht, das gelbe Filtrat durch Schütteln mit Äther von Pikrinsäure befreit und die farblose schwefelsaure Lösung mit Barytwasser von der Schwefelsäure quantitativ entfernt. Darauf schied sich nach dem Einengen des neutral reagierenden Filtrats das freie Octopin ab, welchem nach dem Abkühlen zweckmässig etwas Alkohol zugestzt wurde und das man so als weisse, kreideähnliche Masse erhielt. Diese Substanz bildete mikroskopisch kleine farblose feine Nadeln, welche öfters konzentrisch gruppiert waren, und schmolz bei 281–282° (unkorr.) unter starkem Aufschäumen. Nach dem Trocknen bei 100° wurde die Substanz analysiert.

3,323 mg Substanz gaben 5,332 mg CO₂ und 2,245 mg H₂O.

4,602 mg Substanz gaben 0,928 ccm N (25°, 756 mm).

Für C₉H₁₈N₄O₄ (246,2)

Ber. C 43,87% H 7,27% N 22,75%

Gef. „ 43,76 „ 7,56 „ 22,83

Molekulargewicht.

1,215 g Substanz, in 19 ccm Wasser gelöst, führten zu einer Siedepunktserhöhung von 0,130°,

1,417 g Substanz, in 24 ccm Wasser gelöst, zu einer Siedepunktserhöhung von 0,140°.

Ber. 246,2

Gef. 272, 245.

Spezifisches Drehungsvermögen.

Eine Lösung von 0,3867 g Substanz in 15 ccm Wasser drehte im 20 cm-Rohr das Natriumlicht bei 17° um 1,08° nach rechts.

Somit $[\alpha]_D^{17} = +20,94^\circ$.

Octopinkupfernitrat.

0,08 g Octopin, in wenig Wasser gelöst, wurde mit der vorher

berechneten Menge $n/10$ -Salpetersäure versetzt, so dass sich ein Mononitrat bildete, und dann kurze Zeit mit Kupfercarbonat gekocht. Aus der abfiltrierten klaren, blauen Flüssigkeit schieden sich nach dem Eindampfen hellblaue Kristalle in Nadeln vom Schmelzp. 247° ab.

0,0587 g Substanz ergab nach dem Trocknen bei 100° zur Gewichtskonstanz eine Gewichtsabnahme von 0,0026 g.

Für $C_9H_{18}N_4O_4 \cdot Cu(NO_3)_2 + 2H_2O$

Ber. H_2O 4,84%

Gef. „ 4,77

5,167 mg kristallwasserfreie Substanz gaben 0,575 mg CuO .

Für $C_9H_{18}N_4O_4 \cdot Cu(NO_3)_2$

Ber. Cu 8,54%

Gef. „ 8,83

Beständigkeit von Octopin Mineralsäuren gegenüber.

0,5 g Octopin wurde mit 10 ccm konz. Salzsäure 8 Stunden am Rückflusskühler im siedenden Wasserbad erhitzt und darauf im Vakuum zu dickem Sirup eingedampft. Der Destillationsrückstand wurde in Wasser aufgenommen und durch Erhitzen mit Silbercarbonat vom Chlor befreit. Das Chlorsilberfiltrat wurde zum Entfernen des Silbers mit Schwefelwasserstoff zersetzt und der Schwefelwasserstoff durch Durchleiten von Luft beseitigt. Aus der klaren Flüssigkeit schied sich nach dem Einengen eine farblose mikrokristallinische Masse aus. Ausbeute etwa 0,4 g. Eine Probe schmolz bei 280° und beim Mischen mit Octopin bei 281° , und zwar ohne Depression des Schmelzpunkts. Daher handelte es sich um rektifiziertes Octopin.

Spaltung des Octopins mit Baryt.

5,0 g Octopin wurden mit einem Gemisch von 150 ccm kalt gesättigtem Barytwasser und ebensovielm Wasser am Rückflusskühler gelinde gekocht. Nach einiger Zeit trat eine lebhafte Entwicklung von Ammoniakgas ein, und nach 2 Stunden wurde das Erhitzen eingestellt, wobei die Sakaguchische Reaktion mit einer

Probe noch schwach positiv ausfiel. Darauf wurde das Spaltungsgemisch nach Beseitigung des Bariums mit Kohlensäure im Vakuum zur Trockne eingedampft und dann mit Alkohol dreimal erschöpfend extrahiert. Der Alkoholextrakt kristallisierte nach dem Verjagen des Alkohols in schönen langen Nadeln, welche mit Xanthohydrol einen schwer löslichen Niederschlag gaben und als Nitrat zur Analyse kamen.

2,361 mg Substanz gaben 0,725 ccm N (25°, 756 mm).

Für $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HNO}_3$

Ber. N 34,15%

Gef. „ 34,04

Der in Alkohol unlösliche Teil des Spaltungsgemisches wurde in Wasser aufgenommen und das noch vorhandene minimale Barium mit Schwefelsäure quantitativ entfernt. Die nunmehr deutlich sauer reagierende Flüssigkeit wurde mit einer genügenden Menge Kupfercarbonat kurz gekocht, wodurch sich das letztere unter Gasentwicklung löste und die Lösungsflüssigkeit sich tiefblau färbte. Längeres Auskochen auf freier Flamme war dabei zu vermeiden, weil sich sonst die Flüssigkeit durch das Abscheiden des Kupferoxyds braun färbte. Die vom überschüssigen Kupfercarbonat heiss abfiltrierte tiefblaue Flüssigkeit wurde dann auf dem Wasserbad eingedampft, bis sich das Kupfersalz in hellblauen Kristallaggregaten abschied. Nach 24 stündigem Stehenlassen wurde das ausgeschiedene Salz abgenutscht, das nach nochmaligem Umkristallisieren aus Wasser nun analysenrein erhalten wurde. Das Kupfersalz stellte mikroskopisch kleine, konzentrisch oder büschelförmig vereinigte hellblaue Nadeln oder Stäbchen vom Schmelzpunkt 237°, dar. Es hatte kein Kristallwasser und löste sich nur schwer in kaltem Wasser. Zur Analyse wurde es im Vakuum bei 100° getrocknet.

4,501 mg Substanz gaben 5,937 mg CO_2 , 2,125 mg H_2O und 1,361 mg CuO .

Für $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cu}$

Ber. C 36,13% H 5,31% Cu 23,92%

Gef. „ 35,98 „ 5,30 „ 23,92

Freie Octopinsäure.

Zur Darstellung der freien Octopinsäure wurde das Kupfersalz in Wasser aufgenommen und unter Zusatz von etwas Schwefelsäure in der Hitze gelöst. Das Kupfer wurde durch Schwefelwasserstoff zersetzt und der letztere durch Luftstrom entfernt. Das klare Filtrat von Kupfersulfid wurde mit Barytwasser so weit versetzt, als noch eine geringe Spur Schwefelsäure darin vorhanden war, wodurch man sicher sein konnte, zuletzt ein aschefreies Präparat zu erhalten. Die deutlich sauer reagierende Flüssigkeit lieferte nach dem Eindampfen auf dem Wasserbad eine mikrokristallinische weisse Masse, welche dem Aussehen nach mit dem Octopin grosse Ähnlichkeit hatte. Sie war nach nochmaligem Umkristallisieren aus Wasser analysenrein. Die freie Octopinsäure bildete farblose mikroskopische Nadeln von deutlich saurer Reaktion, die ohne Geschmack waren und unter Zersetzung bei 270–271° (unkorr.) schmolzen. Ausbeute aus 5,0 g Octopin etwa 1,6 g Octopinsäure. Die freie Octopinsäure löst sich in kaltem Wasser schwerer als Octopin (bei 15° in 217 Tln. Wasser).

2,912 mg Substanz gaben 5,028 mg CO₂ und 2,141 mg H₂O.

4,552 mg Substanz gaben 0,524 ccm N (16°, 756 mm).

Für C₈H₁₄N₂O₄ (204,1)

Ber. C 47,02% H 7,90% N 13,73%

Gef. „ 46,98 „ 8,11 „ 13,62

Molekulargewicht.

0,595 g Substanz, in 32 ccm Wasser gelöst, führte zu einer Siedepunkterhöhung von 0,042°,

0,460 g Substanz, in 31 ccm Wasser gelöst, zu einer von 0,035°.

Ber. 204,1

Gef. 226, 218.

Spezifische Drehung.

0,0690 g Substanz, in 15 ccm Wasser gelöst, gaben im 20 cm-Rohr $\alpha = +0,17^\circ$.

Mithin $[\alpha]_D^{20} = +18,48^\circ$.

CYANAMIDSYNTHESE.

Additionsversuch von Octopinsäure und Cyanamid.

Cyanamid vom Schmelzp. 40° wurde durch Zersetzen von käuflichem Calcium cyanamid mit Kohlensäure frisch hergestellt. Davon wurde 0,25 g zu einer Lösung von 0,82 g Octopinsäure in 50 ccm Wasser hinzugefügt und nach Zugabe von 50 ccm kalt gesättigtem Barytwasser das Gemisch bei 37° 17 Tage sich selbst überlassen. Am Anfang zeigte die Flüssigkeit keine Sakaguchische Reaktion. Diese wurde aber nach einiger Zeit positiv und mit den Tagen deutlich stärker. Damit war jedoch noch nicht entscheidend bewiesen, dass sich der gesuchte Additionskörper gebildet hatte, da aus dem Cyanamid ein Polymer, Dicyandiamid, welches auch diese Reaktion positiv zeigt, entstanden sein konnte. Zuletzt wurde aber das noch vorhandene überschüssige Cyanamid nachgewiesen, welches mit ammoniakalischer Silberlösung einen gelblichen Niederschlag gab. Nun wurde die Reaktionsflüssigkeit, nachdem das Barium mit Schwefelsäure quantitativ entfernt worden, mit ein wenig Kupfercarbonat auf freier Flamme einige Minuten gekocht und vom ungelösten heiss abfiltriert. Aus der klaren, tiefblauen Flüssigkeit schied sich nach dem Abdampfen auf dem Wasserbad ein Kupfersalz von unverändert gebliebener Octopinsäure aus, welches nach 24 stündigem Stehen abgenutscht wurde. Das Filtrat wurde durch Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreit und der Schwefelwasserstoff durch Luftstrom entfernt. Die abfiltrierte farblose klare Flüssigkeit wurde mit einer konzentrierten wässrigen Pikrinsäurelösung bis auf kongorotsauer versetzt und dann auf dem Wasserbad bis zum Ausscheiden des Pikrats eingeeengt. Das Pikrat kristallisierte in langen gelben Nadeln und schmolz nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Wasser konstant bei 222° . Dieser Schmelzpunkt war also etwas niedriger als der des Octopinpikrats. Der Mischschmelzpunkt mit letzterem lag bei 223° . Ausbeute 0,7 g.

3,714 mg Substanz gaben 5,080 mg CO_2 und 1,437 mg H_2O .

3,457 mg Substanz gaben 0,603 ccm N ($14,5^{\circ}$, 756 mm).

Für $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot \text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$

Ber.	C 37,87%	H 4,45%	N 20,63%
Gef.	„ 37,30	„ 4,33	„ 20,68

Das Pikrat gab nach dem Entfernen der Pikrinsäure eine freie Substanz in feinen Nadeln. Es schmolz bei 281–282° unter Zersetzung.

3,407 mg Substanz gaben 0,649 ccm N (16°, 763 mm).

Für $C_9H_{18}N_4O_4$

Ber. N 22,76%

Gef. „ 22,59

Spezifische Drehung.

0,2250 g freie Substanz, in 15 ccm Wasser gelöst, gab im 20 cm-Rohr $\alpha = +0,54^\circ$.

$$[\alpha]_D^{25} = +18,00^\circ.$$

Dieser Wert war etwas niedriger als der beim Octopin, was sehr wahrscheinlich mit der beim Verfahren stattgefundenen Razemisierung zusammenhängt.

Darstellung von Monobenzoylderivat der Octôpinsäure.

0,45 g Octopinsäure wurde in 10 ccm Wasser aufgelöst, dann 1,75 g gepulvertes Natriumbicarbonat und unter tüchtigem Schütteln bei Zimmertemperatur 1,5 g Benzoylchlorid (4 Mol) in kleinen Portionen hinzugegeben. Nach anderthalb Stunden war der Geruch nach Benzoylchlorid verschwunden, und als die abfiltrierte Flüssigkeit mit Salzsäure übersättigt wurde, schied sich ein Kristallbrei von Benzoesäure ab, welcher letzterer durch Filtration beseitigt wurde. Die klare Flüssigkeit wurde im Vakuum zu dickem Sirup eingedampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol aufgenommen, wobei das Kochsalz grösstenteils ungelöst zurückblieb. Die vom Kochsalz abfiltrierte alkoholische Lösung wurde nochmals im Vakuum eingeeengt. Die dreimalige Wiederholung derselben Behandlung lieferte einen möglichst vom Kochsalz und der Salzsäure befreiten Sirup, welcher dann in einer kleinen Menge Wasser aufgelöst wurde. Aus der wässrigen Lösung kristallisierten nach langsamem Verdunsten weisse, zu Drusen

vereinigte feine Nadeln aus, welche bei 213–214° nach vorangehendem Sintern gegen 189° schmolzen. Die Kristallwasserbestimmung sowie die Elementaranalyse ergaben nachstehende Werte.

0,2366 g Substanz erfuhr nach 4 stündigem Trocknen bei 100° zur Gewichtskonstanz eine Gewichtsabnahme von 0,0245 g.

Für $C_{15}H_{20}N_2O_5 + 2H_2O$

Ber. H_2O 10,46%

Gef. „ 10,36

4,993 mg Substanz gaben 0,388 ccm N (16°, 770 mm).

Für $C_{15}H_{20}N_2O_5$ (308,1)

Ber. N 9,09%

Gef. „ 9,09

Somit handelte es sich bei der erhaltenen Substanz um das Monobenzoylderivat der Octopinsäure.

Bestimmung der Carboxylgruppen der Octopinsäure.

1) *Analyse des Kupfersalzes.*

5,740 mg Substanz gaben 1,328 mg CuO.

Für $C_8H_{14}N_2O_4Cu$ also als Dicarbonsäure

Ber. Cu 23,92%

Gef. „ 23,57

2) *Titration von Octopinsäure in wässriger sowie alkoholischer Lösung mit Alkalilauge.*

0,0553 g Octopinsäure wurde in 10 ccm Wasser aufgelöst und nach Zusatz von einigen Tropfen Thymolphthaleinlösung mit $n/5$ -NaOH bis auf schön tiefblaue Farbe titriert, wobei bis dahin 2,80 ccm $n/5$ -NaOH verbraucht wurden. Nach dem Entfärben durch Zusatz von 80 ccm neutralem absolutem Alkohol wurde die Lösung abermals bis zu demselben Farbton titriert. Das von Anfang an verbrauchte $n/5$ -NaOH betrug insgesamt 5,30 ccm.

In wässriger Lösung: 2,80 ccm $n/5$ -NaOH entsprechen 0,0286 g Octopinsäure als Dicarbonsäure. Es wurden also 51,6% des angewandten Materials titriert.

In 75%iger alkoholischer Lösung: 5,30 ccm $n/5$ -NaOH entsprechen 0,0541 g Octopinsäure als Dicarbonsäure. Es waren also 97,8% der angewandten Substanz titrierbar.

3) *Formoltitration der Octopinsäure.*

0,0553 g Octopinsäure wurde in 20 ccm Wasser aufgelöst und mit 15 ccm Formolmischung (ein Gemisch von 50 ccm Handelsformol, 25 ccm 95%igem Alkohol und 5 ccm Thymolphthaleinlösung mit $n/5$ -NaOH bis zu bläulichem Farbton zugegeben) versetzt und nach Zusatz von Thymolphthalein mit $n/5$ -NaOH bis zur schön tiefblauen Farbe titriert. Es wurden verbraucht 2,64 ccm $n/5$ -NaOH, welche Menge 0,0538 g Octopinsäure als Dicarbonsäure entspricht. Somit waren 97,2% der angewandten Säure titrierbar.

4) *Titration der Momobenzoyloctopinsäure mit Alkalilauge.*

0,0616 g kristallwasserfreie Substanz wurde in 20 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von Thymolphthalein mit $n/5$ -NaOH bis zu tiefblauer Farbe titriert, wobei 3,60 ccm $n/5$ -NaOH verbraucht wurden. Weiter wurde nach dem Entfärben durch Zusatz des gleichen Volumens Alkohols wiederum bis auf denselben Farbton titriert, wobei noch 0,50 ccm Lauge erforderlich war, so dass insgesamt 3,98 ccm Lauge Verwendung fanden.

In wässriger Lösung: 3,60 ccm $n/5$ -NaOH entsprachen 0,0554 g Substanz als Dicarbonsäure, also 90% des verwendeten Materials.

In 50%iger alkoholischer Lösung: 3,98 ccm $n/5$ -NaOH entsprachen 0,0612 g Substanz, somit 99,0% der Theorie.

Bestimmung des durch die van Slykesche Methode ermittelbaren Aminostickstoffs der Octopinsäure.

- 1) 0,0305 g Substanz wurde in 5 ccm Wasser gelöst.
2,0 ccm dieser Lösung (entsprechend 0,0122 g) ergaben
in 5 Minuten 1,08 ccm N(19°, 764 mm); N 5,18%,
in 100 Minuten 1,41 ccm N(19°, 764 mm); N 6,60%.
- 2) 0,0331 g Substanz wurde in 5 ccm Wasser gelöst.

2,0 ccm dieser Lösung (entsprechend 0,0132 g) ergaben
in 5 Minuten . 1,08 ccm N(18°, 764 mm) ; N 4,81%,
in 100 Minuten 1,55 ccm N(18°, 764 mm) ; N 6,85%.
Für eine Hälfte des Gesamtstickstoffs

Ber. N 6,85%

Aus den obenangegebenen Resultaten kann man ersehen, dass von zwei Atomen Stickstoff der Octopinsäure sich nur der eine als Aminostickstoff nachweisen lässt, wobei die Reaktion sehr langsam vor sich geht, und zwar erst nach 30 Minuten beendet ist.

Oxydation von Octopin mit Bariumpermanganat.

Zu einer Lösung von 1,0 g Octopin in 10 ccm Wasser, welche sich in einem an der Wasserleitung ständig gekühlten Reaktionskolben befand, wurde eine Lösung von 1,0 g Bariumpermanganat (2 Mol Sauerstoff) in 15 ccm Wasser unter Schütteln tropfenweise hinzugegeben. Im Anfang ging die Entfärbung nicht sofort schnell, sondern nur langsam vor sich, wurde aber mit dem Fortschreiten der Reaktion infolge der Alkalitätszunahme des Mediums immer rascher. Nachdem das Oxydationsmittel völlig verbraucht war, wurde das Reaktionsgemisch von dem entstandenen Manganoxyschlamm abfiltriert und durch Kohlensäure vom Barium befreit. Dem Bariumfiltrat wurde Schwefelsäure bis zu 5% zugesetzt und dann soviel 30%ige Phosphorwolframsäurelösung, bis kein Niederschlag mehr entstand. Der Niederschlag wurde nach längerem Stehen abgenutscht, ausgewaschen und in gewohnter Weise mit Ätzbaryt zerlegt. Die vom Barium durch Kohlensäure befreite Basencarbonatlösung wurde mit konz. wässriger Pikrinsäurelösung versetzt. Aus der Lösung liess sich nach dem Einengen ein in Wasser schwer lösliches Pikrat gewinnen, welches gegen 315° unter Zersetzung schmolz, und bei dem aus der Kristallform sowie Löslichkeit auf Guanidinpinkrat zu schliessen war. Leider konnten wegen der geringen Menge keine analytischen Belege geliefert werden. Das Filtrat des obigen Pikrats wurde nun mit Salzsäure stark sauer gemacht und die Pikrinsäure ausgeäthert. Aus der nun stark salzsauren wässrigen Flüssigkeit erschienen nach dem Ein-

engen im Vakuum kleine farblose Prismen vom Schmelzpunkt 184° . Ausbeute etwa 0.1 g. Die Mischprobe mit γ -Guanidinbuttersäurechlorhydrat zeigte keine Depression des Schmelzpunktes.

4,564 mg Substanz gaben 5,523 mg CO_2 und 2,713 mg H_2O .

4,457 mg Substanz gaben 0,877 ccm N (17° , 756 mm).

Für $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$

Ber. C 33,04% H 6,66% N 23,14%

Gef. „ 33,01 „ 6,58 „ 23,06

Der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Anteil wurde in üblicher Weise auf sonstige Oxydationsprodukte hin untersucht. Hierbei fand sich ausser flüchtigen Fettsäuren eine minimale Menge Bernsteinsäure, sonst kein weiterer bemerkenswerter Befund.

*Isolierung von Arginin aus dem Muskelextrakt
von Octopoden.*

Die bei der Isolierung des Octopins als Pikrat zurückgebliebene und möglichst davon befreite Mutterlauge schied nach weiterem Einengen Pikrat in mehreren Fraktionen aus, teils einheitlich in feinen Nadeln, teils in Kristallkrusten von unbestimmten Formen. Das ganze Pikrat der verschiedenen Fraktionen, insgesamt etwa 7 g, wurde vereinigt und durch Ausäthern der Pikrinsäure in Basencarbonatlösung übergeführt. Die nun alkalisch reagierende Lösung, welche nicht nur die Sakaguchische, sondern auch die Ninhydrinreaktion stark positiv zeigte, wurde durch Zusatz von Flaviansäure in Flavianat verwandelt. Das schwer lösliche Flavianat lieferte nach dem Befreien von der Flaviansäure einen Sirup, woraus zunächst das Hydrochlorid vom Schmelzp. 198 – 199° gewonnen wurde. Ausbeute 1,8 g. Dann wurden aus dem Hydrochlorid das Nitrat vom Schmelzp. 216° und das Kupfernitratdoppelsalz vom Schmelzp. 225 – 226° dargestellt.

Analytische Belege mit Hydrochlorid.

Das Hydrochlorid wurde nach dem Trocknen zur Gewichtskonstanz bei 110° analysiert.

3,191 mg Substanz gaben 0,731 ccm N (21° , 763 mm).

4,141 mg Substanz gaben 0,948 ccm N(20°, 756 mm).

Für $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl$

Ber. N 26,50%

Gef. „ 26,58 26,54

Spezifisches Drehungsvermögen.

1,3046 g Substanz, in 15 ccm Wasser gelöst, (8,7%) ergaben

$\alpha = +0,66^\circ$, somit $[\alpha]_D^{15} = +3,79^\circ$.

Nach Gulewitsch (1899) zeigte das *d*-Argininhydrochlorid in 9,3%iger Lösung $[\alpha] = +10,70^\circ$. Daher dürfte das gewonnene Salz zu etwa 65% die inaktive Form enthalten.

Zum Schluss ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. K. Mayeda für seine unmittelbare Leitung bei der vorliegenden Arbeit und ebenso Herrn Prof. Dr. S. Utzino für seine methodischen Hinweise meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATURVERZEICHNIS.

- Kutscher, Fr. u. Ackermann, D. (1927): Zeit. f. Biol., **84**, 181.
 Kutscher, Fr. u. Ackermann, D. u. Flösner, O. (1931): Zeit. f. physiol. Chem., **199** 273.
 Kutscher, Fr. u. Benech, E. (1901): Zeit. f. physiol. Chem., **32**, 278 u. 413.
 Matsumoto, A. (1928): Acta scholae medicinalis Kioto, **10**, 281.
 Mayeda, H. (1936): Acta scholae medicinalis Kioto **18**, 218.
 Morizawa, K. (1927): Acta scholae medicinalis Kioto, **9**, 285.
 Suzuki, U., Yoshimura, K., Yamakawa, M. u. Irie, Y. (1909): Zeit. f. physiol. Chem., **62**, 1.
 Wada, M. (1930): Biochem. Zeitschr., **224**, 420.

STUDIEN ÜBER DIE KONSTITUTION DES OCTOPINS.

II. Mitteilung: Synthetische Versuche.

VON

SYŪZO AKASI.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Kyôto.
Vorstand: Prof. Dr. K. Mayeda.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1936)

In meiner ersten Mitteilung habe ich mittels hydrolytischer und oxydativer Abbauprobe gezeigt, dass es sich bei der Hauptkette des Octopins um eine dem Guanidinderivat zugehörige Dicarbonsäure handelt von der Formel

$$\text{HN} \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ | \\ \text{C} \end{array} \text{—NH—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—C} \equiv \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \text{COOH} \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{N} \end{array}.$$

Es erschien mir zweckmässig, bei der weiteren Forschung über die Konstitution des Octopins nicht die Abbau-, sondern die Synthesemethoden anzuwenden. Es wurde deshalb, wie unten angegeben, eine Reihe von Syntheseversuchen durchgeführt, und dabei gelang es mir, das Octopin synthetisch darzustellen, wodurch die Konstitution desselben einwandfrei sichergestellt wurde.

Die Syntheseveruche wurden in erster Linie wie folgt ausgeführt. Ich wählte das *d*-Arginin, das in der Natur vorkommt, als Ausgangsmaterial und bedeckte seine α -Stellung mit der Propionsäure derart, dass sie eine Iminodicarbonsäure darstellte. Dies ist sicher zu erreichen, wenn man α - bzw. β -Halogenfettsäure auf das Arginin einwirken lässt. In neuerer Zeit haben E. Abderhalden und E. Haase (1931) eine Methode ausgearbeitet, Iminodicarbonsäure aus Aminosäuren und Halogenfettsäuren zu gewinnen. Diese Forscher haben verschiedene einheitliche Produkte durch Einwirkung von Halogenfettsäure, wie Halogenessigsäure bzw. -propionsäure, auf Aminosäuren, wie Glykokoll, Alanin und Valin, in alkalischer Lösung darstellen können. Ich studierte bei meinem Falle zunächst die Reaktion von β -Brompropionsäure mit *d*-Arginin, wobei ich schliesslich eine neue Substanz von der chemi-

sehen Struktur der δ -Guanidino-butyl-äthylamin- α,β' -dicarbonsäure oder kurz der *d*-Arginin-*N*- β -propionsäure gewann. Das Reduktionsprodukt wurde zunächst als in Wasser schwer lösliches Pikrat aus dem Reaktionsgemisch isoliert. Das Pikrat, welches dieselbe Zusammensetzung wie das Octopinpikrat besass, schmolz bei 225° und zeigte keine merkbare Depression des Mischschmelzpunkts mit dem letzteren. Die Kristalle, ebenfalls derbe Prismen, wichen aber in ihrer Form unter dem Mikroskop insofern von den Octopinpikratkristallen ab, als sie an beiden Enden flach endeten und nicht spiessartig zugespitzt waren. Der aus dem Pikrat gewonnene freie Körper bildete kleine, bei 275 – 276° schmelzende Prismen und lieferte nach dem Zersetzen mit Baryt ausser dem Harnstoff keine kristallinen Abbauprodukte mehr. Diesen und noch später zu erwähnenden Eigenschaften nach handelte es sich bei dem neuen synthetischen Produkt um ein Isomer des Octopins.

Bei dem zweiten Versuche wurde α -Brompropionsäure mit *d*-Arginin gekoppelt. Hierbei kamen drei mögliche Kuppelungsprodukte in Betracht, dass α -Brompropionsäure in drei Formen, nämlich in zwei aktiven und einer inaktiven, vorhanden ist. In erster Linie wurde aber die am leichtesten herstellbare *dl*-Form auf *d*-Arginin einwirken gelassen. Das synthetische Produkt wurde in derselben Weise wie beim vorangehenden Versuch isoliert, indem ich nämlich das Reaktionsgemisch zunächst mit Phosphorwolframsäure fällte und die damit fällbare Fraktion durch Zugabe von Pikrinsäure in das Pikrat überführte, welches letzteres ich dann der fraktionierten Kristallisation unterwarf. Der schwer lösliche Anteil bestand nach abermaliger Umkristallisation aus dem Pikrat vom Schmelzp. 225° , woraus nach dem Befreien von der Pikrinsäure ein Produkt zum Vorschein kam, das in seinen physikalischen sowie chemischen Eigenschaften mit dem Naturoctopin völlig übereinstimmte (Figs. 1 u. 2). Dasselbe lieferte auch durch Barythydrolyse ausser dem Harnstoff noch eine Substanz, welche mit der Octopinsäure völlig identisch war. Diese Versuchsergebnisse zeigten klar, dass man das Octopin aus *d*-Arginin und *dl*- α -Brompropionsäure synthetisch erhalten kann, und auf Grund des synthetischen Vorgangs wurde ihm die Konstitution von δ -Guanidino-

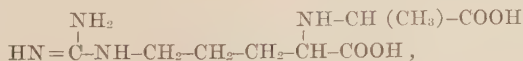
butyl-äthylamin- α,α' -dicarbonsäure, bzw. α -(Imino- α -propionsäure)- δ -Guanidino-*N*-valeriansäure oder kurz *d*-Arginin-*N*- α -propionsäure zugeschrieben.

Dabei steht aber hinsichtlich der stereochemischen Struktur noch die Frage offen, ob die Brompropionsäure, welche sich bei der Bildung des Octopins an das *d*-Arginin bindet, in Wirklichkeit die inaktive oder die aktive *d*- bzw. *l*-Form ist. Bei dem gewonnenen Produkt ist wohl anzunehmen, dass es sich bei ihm um ein gemischtes handelt, dass nämlich die Hälfte desselben aus *d*-Arginin und *d*- α -Brompropionsäure und die andere aus *d*-Arginin und *l*- α -Brompropionsäure entstanden ist. Hier ist aber noch an die Möglichkeit zu denken, dass ein solches Gemisch, wenn es wie bei meinem Versuch als Pikrat der fraktionierten Kristallisation unterworfen wird, infolge des Löslichkeitsunterschieds der Pikrate beider Modifikationen in seine optischen Antipoden zerlegt werden könnte, wodurch anstatt der *d*-Arginin-*N*-*dl*- α -propionsäure entweder die *d*-Arginin-*N*-*d*- α -propionsäure oder die *d*-Arginin-*N*-*l*- α -propionsäure auftritt.

Zur Beantwortung dieser Frage bedarf es einer weiteren Synthese mit der aktiven Brompropionsäure. Ich stellte daher die *l*- α -Brompropionsäure aus dem *d*-Alanin und die *d*- α -Brompropionsäure aus dem *l*-Alanin, beide in Anlehnung an das Fischersche Verfahren her und liess jede für sich auf das *d*-Arginin einwirken. Dabei schied sich merkwürdigerweise beim Versuch mit der *d*-Brompropionsäure kein Pikrat kristallinisch aus, beim Versuch mit der *l*-Brompropionsäure dagegen ein in Wasser schwer lösliches Pikrat, das mit dem des Octopins ganz identisch war und sich sogar in einer grösseren Menge isolieren liess.

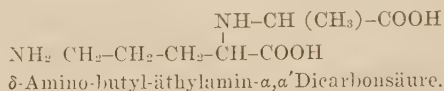
Daraus war zu schliessen, dass es sich bei der Brompropionsäure, die an der Octopinbildung teilnimmt, um die *l*-Form handelt, und zugleich wurde die Richtigkeit der obigen Arbeitshypothese, einen Löslichkeitsunterschied der Pikrate beider optischen Antipoden anzunehmen, experimentell mit aller Sicherheit bewiesen.

Die Konstitution des Octopins ist demnach



δ -Guanidino-butyl-äthylamin- α, α' -dicarbonsäure oder
 d -Arginin-N- α -Propionsäure

und die der Octopinsäure



Es sei hier noch hinzugefügt, dass das Octopin als eine Imino-dicarbonsäure zu betrachten ist, welche man in der belebten Natur erst jetzt, und zwar im Tierreich zunächst bei Octopus und dann bei anderen Mollusken festgestellt hat.

EXPERIMENTELLER THEIL.

Synthese des Octopins aus dl-Brompropionsäure und d-Arginin.

11,4 g d -Argininmonochlorhydrat ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$), in 500 ccm Wasser aufgelöst, wurden mit 7,6 g (9,0 ccm) dl - α -Brompropionsäure (2 Mol) vom Siedepunkt $98-100^\circ/14$ mm und vom spezifischen Gewicht $d_4^{24} = 1,6913$ versetzt und zu allem weiter 200 ccm n -NaOH hinzugefügt. Das Gemisch wurde dann bei 37° 72 Stunden stehen gelassen, wobei zwecks Berechnung des in die Reaktion eingetretenen Arginins der durch die van Slykesche Methode feststellbare Aminostickstoff sofort am Beginn und am Ende der Reaktion ermittelt wurde. Es ergab sich, dass der Gesamtstickstoff des Arginins eine Verminderung um 72,86% erfahren hatte.

Darauf wurde das Reaktionsgemisch mit Schwefelsäure bis zu 5% versetzt und 30%ige Phosphorwolframsäurelösung so lange hinzugefügt, als noch ein Niederschlag entstand. Da der Niederschlag teils im kolloidalen Zustand ausfiel, was die schnelle Filtration wesentlich erschwerte, so empfahl es sich, ihn durch Erwärmen wieder aufzulösen und dann stark abzukühlen, wodurch er ohne Verlust kristallinisch ausgeschieden wurde. Nach der vollständigen Ausfällung des Phosphorwolframatniederschlags wurde dieser abgenutscht, ausgewaschen und in gewohnter Weise mit Ätzbaryt zerlegt. Die durch Kohlensäure vom Barium befreite klare Flüssig-

keit wurde auf dem Wasserbad eingedampft und mit konz. wässriger Pikrinsäurelösung bis auf stark kongorotsauer versetzt. Beim Einengen der Lösung bis zu etwa 150 ccm schied sich das Pikrat in prismatischen Kristallen aus, welche sich nach dem Abkühlen stark vermehrten. Das Rohprodukt lieferte nach der nochmaligen Umkristallisation aus viel heissem Wasser ein Pikrat vom Schmelzpt. 225°. Die Ausbeute betrug etwa 5,5 g. Das Pikrat bestand aus an einem oder beiden Enden spiessartig zugespitzten Nadeln oder Prismen von ganz ähnlicher Kristallform wie die des Naturoctopinpikrats (Fig. 1). Die Mischprobe mit dem letzteren ergab keine Depression des Schmelzpunktes.

4,754 mg Substanz gaben 0,811 ccm N (15°, 770 mm).

5,779 mg Substanz gaben 0,652 ccm N (16°, 770 mm).

Für $C_9H_{18}N_4O_4 \cdot C_6H_3N_3O_7$

Ber. N 20,63%

Gef. „ 20,46, 20,65.

Der aus dem Pikrat frei gewordene Körper stellte feine, farblose Nadeln vom Schmelzpt. 281–282° dar und zeigte beim Mischen mit Octopin keine Depression des Schmelzpunktes (Fig. 2).

3,042 mg Substanz gaben 4,869 mg CO₂ und 2,025 mg H₂O.

2,042 mg Substanz gaben 0,559 ccm N (16°, 763 mm).

Für $C_9H_{18}N_4O_4$

Ber. C 43,87% H 7,37% N 22,75%

Gef. „ 43,65 „ 7,45 „ 22,63

Spezifische Drehung.

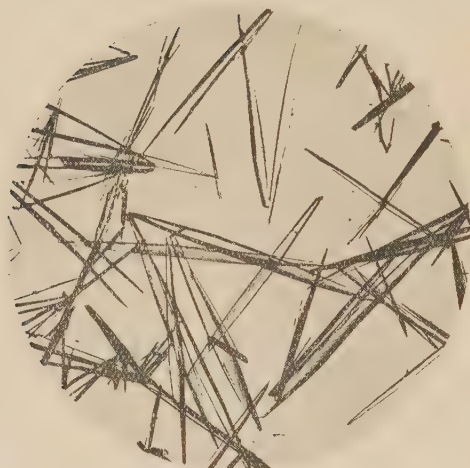
Eine Lösung von 0,3867 g Substanz in 15 ccm Wasser drehte im 20 cm-Rohr bei 17° das Natriumlicht um 1,08° nach rechts.

Mithin $[\alpha]_D^{17} = +20,94^\circ$.

Darstellung der Octopinsäure aus synthetischem Octopin.

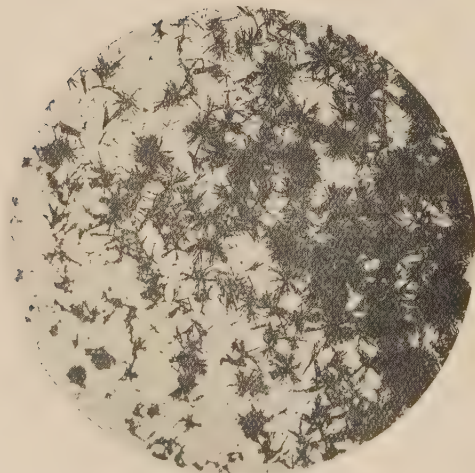
1,0 g des oben gewonnenen Octopins wurde in ganz gleicher Weise wie beim Naturoctopin mit Ätzbaryt zerlegt. Aus dem Alkoholextrakt der Zersetzungsprodukte liess sich der Harnstoff als Nitrat isolieren. Der in Alkohol unlösliche Teil lieferte ein Kupfer-

Fig. 1.



Synthetisches Octopinikrat.
($\times 100$)

Fig. 2.



Synthetisches Octopin.
($\times 100$)

salz, woraus durch Zersetzen mit Schwefelwasserstoff eine sauer reagierende Substanz in feinen, farblosen Nadeln vom Schmelzpt. 270–271° gewonnen wurde. Der Schmelzpunkt einer Mischprobe mit Naturoctopinsäure zeigte keine Depression. Ausbeute 0,26 g.

2,995 mg Substanz gaben 5,023 mg CO₂ and 2,141 mg H₂O.

3,630 mg Substanz gaben 0,410 ccm N (16°, 763 mm).

Für C₈H₁₆N₂O₄

Ber. C 47,02% H 7,90% N 13,73%

Gef. „ 46,81 „ 8,00 „ 13,48

Spezifische Drehung.

0,0690 g Substanz, in 15 ccm Wasser aufgelöst, gab im 20 cm-Rohr $\alpha = +0,16^\circ$.

Somit $[\alpha]_D^{19} = +17,39^\circ$.

Synthese des Octopins aus d-Arginin und optisch aktiver α -Brompropionsäure.

1) Gewinnung der l- α -Brompropionsäure.

Diese Säure lässt sich nach zwei Methoden gewinnen. Bei der einen Methode gelangt man, von der *dl*- α -Brompropionsäure ausgehend, über deren Cinchoninsalz zur *l*-Komponente, und bei der anderen wandelt man durch Einwirkung von Nitrosylbromid auf das *d*-Alanin das letztere in *l*- α -Brompropionsäure um. Ich verwendete beim vorliegenden Versuch die letztere Methode. Das reine *d*-Alanin aus Seide von $[\alpha]_D^{27} = +2,70^\circ$ wurde in Schwefelsäure aufgelöst, und durch diese schwefelsaure Lösung wurde nach Zusatz einer bestimmten Menge Brom einige Stunden lang unter Eiskühlung Stickoxydgas geleitet. Nach dem Ausäthern der gebildeten Säure und dem Verjagen des Äthers wurde ein bei 98–100° und unter 14 mm Druck siedendes Öl vom spez. Gew. 1,6992 erhalten. Es drehte bei 10° das Natriumlicht im 1 dm-Rohr um 40,22° nach links.

2) Gewinnung der d- α -Brompropionsäure.

Dieselbe wurde ebenfalls wie *l*- α -Brompropionsäure durch Ein-

wirkung von Nitrosylbromid auf *l*-Alanin dargestellt. Das *l*-Alanin kann man aus *dl*-Alanin entweder auf dem Umwege über das Brucinsalz des Benzoylderivats hinweg oder unmittelbar mit Hilfe der biologischen asymmetrisch spaltenden Wirkung der Schimmelpilze darstellen. Beim vorliegenden Versuch wurde die Brucinsalzmethode gewählt, mittels welcher aus 135 g synthetisch hergestelltem *dl*-Alanin 22 g *l*-Alanin von $[\alpha]_D^{17} = -2,55^\circ$ gewonnen wurden. Die aus diesem *l*-Alanin hergestellte *d*- α -Brompropionsäure besass bei 15° das spez. Gewicht von 1,6995 und drehte bei 10° das Natriumlicht im 1 *dm*-Rohr um $41,68^\circ$ nach rechts.

3) Versuch mit *l*- α -Brompropionsäure.

Eine Lösung von 11,4 g *d*-Argininmonochlorhydrat in 500 ccm Wasser wurde mit 9,0 ccm *d*- α -Brompropionsäure und 200 ccm *n*-NaOH zusammengebracht und bei 37° 72 Stunden stehen gelassen. Die Ermittlung des freien Aminostickstoffs nach van Slyke ergab eine Verminderung des Anfangsaminostickstoffs um 72,90%. Die Verarbeitung des Reaktionsgemisches geschah in ganz gleicher Weise wie beim vorangehenden Syntheseversuch. Diesmal aber wurden, wie beim nachfolgenden Versuch, der freie Amino- sowie der Gesamtstickstoff mittels der durch Zerlegen des Phosphorwolframatniederschlags gewonnenen freien Basenlösung quantitativ bestimmt und aus den gefundenen Werten der Arginin- und Nichtargininstickstoff berechnet. Dabei ergab sich, dass der Nichtargininstickstoff 70,27% des Gesamtstickstoffs (d.h. Arginin-N + Nichtarginin-N) ausmachte.

Die Basenlösung wurde nun mit 12 g in heissem Wasser gelöster Pikrinsäure versetzt und dann verdampft, wobei es endlich zu reichlicher Kristallisation des Pikrats kam. Ausbeute 13,8 g Rohpikrat. Es war nach einmaliger Umkristallisation bereits rein und besass einen Schmelzpunkt von 225° . Mit Naturoctopin trat keine Schmelzpunktsdepression ein.

4,155 mg Substanzen gaben 6,640 mg CO_2 und 2,751 mg H_2O .

3,840 mg Substanz gaben 0,790 ccm N (25° , 766 mm).

Für $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$

Ber. C 43,87% H 7,27% N 22,75%

Gef. ,, 43,58 ,, 7,41 ,, 22,60

• *Spezifische Drehung.*

0,3867 g Substanz. in 15 cem Wasser gelöst, gab im 2dm-Rohr $\alpha = +1,08^\circ$.

Hiermit $[\alpha]_D^{16} = +20,94^\circ$.

4) *Versuch mit d- α -Brompropionsäure.*

Derselbe wurde in ganz gleicher Weise wie der obige mit der l- α -Brompropionsäure ausgeführt. Die quantitative Untersuchung mit der freien Basenlösung auf den Gehalt des Arginin- sowie Nichtargininstickstoffs zeigte, dass 70,40% des Gesamtstickstoffs (Arginin-N + Nichtarginin-N) aus Nichtargininstickstoff bestanden.

Die freie Basenlösung wurde nach Zusatz von 12 g Pikrinsäure auf dem Wasserbad eingeeengt, wobei kein Pikrat kristallinisch erschien, sondern sich beim starken Eindampfen eine ölige Masse ausschied, die keine Neigung zur Kristallisation aufwies.

Synthese von δ -Guanidino-butyl-äthylamin- α,β' -dicarbonsäure, einem Stellungsisomer des Octopins.

1) *Gewinnung der β -Brompropionsäure.*

Das aus Glycerin frisch hergestellte Acrolein wurde durch Addition von Bromwasserstoffsäure in β -Brompropylaldehyd übergeführt, welch letzteres dann mit rauchender Salzpetersäure zu β -Brompropionsäure oxydiert wurde. Diese Säure stellte fettartig glänzende Blättchen mit einem Schmelzpunkt von 62° dar.

2) *Versuch mit β -Brompropionsäure.*

11,4 g d-Argininmonochlorhydrat wurden in 500 cem Wasser aufgelöst, mit 7,6 g β -Brompropionsäure und 100 cem n-NaOH versetzt, worauf alles bei 37° 72 Stunden stehen gelassen wurde. Nach beendeter Reaktion wurde an einer Probe der Aminostickstoff nach van Slyke ermittelt, wobei eine Verminderung des Anfangsaminostickstoffs um 56,6% festgestellt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst mit Phosphorwolframsäure gefällt und der Niederschlag durch Atzbaryt zerlegt. Der freien Basenlösung wurden

12 g in Wasser gelöster Pikrinsäure hinzugefügt und die Lösung im Vakuum stark eingengt. Der Rückstand wurde einmal mit viel heissem 95%igem Alkohol extrahiert, in den überschüssige Pikrinsäure und ein Teil des Pikrats des unverändert gebliebenen Arginins übergingen. Der Extraktionsrückstand wurde in etwa 400 ccm heisses Wasser aufgenommen und alles auf dem Wasserbade eingedampft, wobei sich reichlich ein schwer lösliches Pikrat ausschied. Das Pikrat schmolz nach der einmaligen Umkristallisation aus Wasser bei 225° und der Schmelzpunkt der Mischprobe mit Octopinpikrat war ebenfalls 225°. Ausbeute ca. 8.0. Das Pikrat kristallisierte in rhombischen Prismen und reagierte sauer nicht nur gegen Lackmus, sondern auch gegen Kongorot. Der daraus gewonnene freie Körper kristallisierte in kleinen farblosen Prismen ohne Kristallwasser und schmolz bei 275–276°. Der Mischschmelzpunkt mit Octopin lag bei 272–273°. Der Körper reagierte gegen Lackmus deutlich sauer und zeigte die Sakaguchische Reaktion stark positiv, die Ninhydrinreaktion aber nicht. Er verhielt sich Mineralsäure gegenüber sehr beständig, wurde aber durch Kochen mit Barytwasser leicht zersetzt, wobei sich ausser dem Harnstoff kein weiteres Produkt kristallinisch isolieren liess. Die Elementaranalyse wurde mit der freien Substanz vorgenommen.

3,590 mg Substanz bagen 5,726 mm CO₂ und 2,363 mg H₂O.

2,660 mg Substanz gaben 0,516 ccm N (16°, 763 mm).

Für C₉H₁₈N₄O₄

Ber. C 43,87% H 7,27% N 22,75%

Gef. „ 43,60 „ 7,36 „ 22,56

Spezifische Drehung.

0,1186 g Substanz, in 15 ccm Wasser gelöst, gab im 2dm-Rohr $\alpha = +0,55^\circ$.

Mithin $[\alpha]_D^{24} = +23,18^\circ$.

LITERATURVERZEICHNIS.

Abderhalden, E. u. Haase, E. (1931): Zeit. f. physiol. Chem., **202**, 49.

STUDIEN ÜBER DIE KONSTITUTION DES OCTOPINS.

III. Mitteilung: Stereochemische Untersuchung mittels der Drehkurvenmethode nach Lutz.

VON

SYŪZO AKASI.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Kyōto.

Vorstand: Prof. Dr. K. Mayeda.)

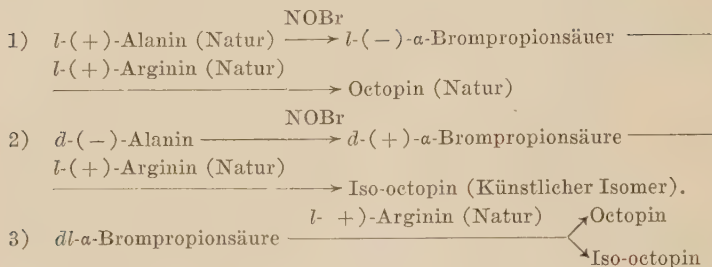
(Eingegangen am 28. Dezember 1936)

In meiner vorangehenden Abhandlung wurde mitgeteilt, dass das Octopin sich aus dem *d*-Arginin und der *dl*- α -Brompropionsäure synthetisch darstellen lässt, wodurch erst seine Konstitution klar gestellt wurde.

Bei weiterer Untersuchung konnte ich aus dem Reaktionsgemisch von *d*-Arginin und *d*- α -Brompropionsäure ein Stereoisomer des Octopins isolieren. Diese Substanz, die vorläufig Iso-octopin genannt sei, kristallisierte mit 2 Mol Kristallwasser in langen, glänzenden Nadeln und hatte die Zusammensetzung $C_9H_{18}N_4O_4 + 2H_2O$. Sie schmolz bei 158–159° unter Zersetzung und löste sich in Wasser schwerer als Octopin. Die wässrige Lösung drehte das polarisierte Licht nach rechts. $[\alpha]_D^{18} = +25,77^\circ$. Diese Substanz gab ein Pikrat, welches sich unter dem Mikroskop als feine, filzähnliche Kristalle darstellte und bei 198° unter Zersetzung schmolz. Das Pikrat war im Gegensatz zum Octopinpikrat in Wasser sehr leicht löslich, und gerade auf diesem merkwürdigen Löslichkeitsunterschied des Octopin- und Iso-octopinpikrats beruhte es, dass ich beide beim synthetischen Versuch mit *d*-Arginin und *dl*- α -Brompropionsäure in reiner Form und genügender Menge isolieren konnte.

Nun sei unter Anwendung der Schreibweise des optisch aktiven Körpers nach A. Wohl und K. Freudenberg, nämlich unter Benutzung der Buchstaben *d* und *l* sowie der Zeichen + und –, der synthetische Vorgang meiner Untersuchung in folgenden

Formulierungen dargestellt:



Aus diesem Schema ist zu ersehen, dass dem Octopin entweder die *l,l*-Form oder die *l,d*-Form, keineswegs aber die halbracemische *l,dl*-Form zu gehört. Die letztere Form liess sich in der Tat experimentell durch fraktionierte Kristallisation ihres Pikrats in beide optischen Antipoden zerlegen.

Bei der Einwirkung der Halogenfettsäuren auf Aminbasen ist im allgemeinen zu berücksichtigen, dass es hierbei zur Umkehrung der Konfiguration, zur sogenannten Waldenschen Umkehrung, kommen kann. Diese konfigurative Umwandlung verläuft bei einem Falle im positiven und bei einem anderen im negativen Sinne, worüber heute noch ein eindeutiger Aufschluss aussteht. Die obigen synthetischen Reaktionen stehen in innigem Zusammenhange mit diesem sehr komplizierten chemischen Vorgang, und wenn eine Umkehrung am asymmetrischen Kohlenstoffatom der *l*-(-)- α -Brompropionsäure vor sich geht, so ist das Octopin als *l,d*-Form, anderenfalls als *l,l*-Form zu betrachten. Es dürfte ein schwieriges Problem sein, diese Frage nach der einen oder anderen Seite hin direkt auf chemischem Wege endgültig zu beantworten.

Vor einigen Jahren haben O. Lutz und Br. Jirgensons (1930) über eine Drehkurvenmethode zur Ermittlung der Konfiguration berichtet, nach der die optische Zugehörigkeit des optisch aktiven Körpers, besonders der α -Aminosäuren, indirekt auf physikalischem Wege, d. h. durch graphische Darstellung der spezifischen Drehungen bei verschiedenen Medien geprüft werden kann.

Die Drehkurvenmethode ist wie folgt: Man nimmt für eine

Versuchsreihe stets dieselbe Menge aktiver Aminosäure und versetzt die einzelnen Proben mit ansteigenden Mengen von Säure oder Base. Die erhaltenen Drehwerte trägt man in ein Kurvensystem ein, auf dem die Abszissen die positiven oder negativen Drehwerte bedeuten, die Ordinaten hingegen die Anzahl der hinzugefügten Salzsäure- oder Natriumhydroxymoleküle. Die so gewonnenen Punkte verbindet man zu einer Kurve, aus deren Verlauf, besonders im sauren Gebiete, sich Schlüsse auf die Zugehörigkeit der α -Aminosäuren zur Rechts- oder Linksreihe ziehen lassen. Die Kurven verlaufen von 10 Mol Salzsäure bis zu 0 Mol stets von rechts nach links, wenn ein Links-Isomer untersucht wird, und von links nach rechts, wenn umgekehrt ein Rechts-Isomer konstatiert werden soll. Oder anders ausgedrückt, wächst der Drehwert mit steigender Säurekonzentration im positiven Sinne für Links- und im negativen Sinne für Rechtsantipoden.

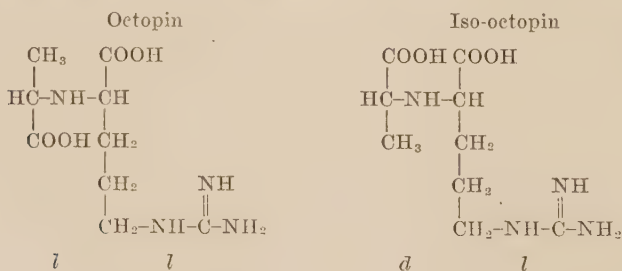
Durch diese graphische Methode haben Lutz und Jirgensons zeigen können, dass die sämtlichen natürlichen α -Aminosäuren der Linksreihe angehören und daraus die Schlussfolgerung gezogen, dass sich mit Hilfe dieser Methode entscheiden lässt, ob synthetische, substituierte Aminosäuren der Rechts- oder Linksreihe angehören, und zwar auch dann noch, wenn die Konstatierung einer Umkehrung mit den einfachen Mitteln Waldens, E. Fischers, Alex. Mc Kenzies u. a. nicht möglich erscheint.

So habe auch ich mich bei der vorliegenden Untersuchung zum Zwecke der Erläuterung der stereochemischen Struktur des Octopins dieser Drehkurvenmethode bedient.

Als Versuchsmaterial verwendete ich vier Proben: Octopin, Iso-octopin, eine Mischprobe, welche aus dem Äquimolekül der beiden letzteren Substanzen bestand, und ferner den β -Isomer. Der β -Isomer, welcher vor kurzem (II. Mitteilung) aus *d*-Arginin und β -Brompropionsäure synthetisch dargestellt wurde, ist als Stellungsisomer des Octopins zu betrachten. Von der Mischprobe aus Octopin und Iso-octopin wurde erwartet, dass ihre Propionsäuregruppe durch das Mischen des Äquimoleküls beider Substanzen inaktiviert, d. h. in die *l,dl*-Form umgewandelt wurde. Im gleichen stereochemischen Verhältnisse mit der letzteren Probe stand auch

der β -Isomer, dessen Propionsäuregruppe ersichtlich kein asymmetrisches Kohlenstoffatom trug, und er also ebenfalls der gleichnamigen l,d -Form zugehörte. Es war demnach vorauszusehen, dass die zwei letzteren Substanzen, nämlich der β -Isomer und die Mischprobe, den gleichsinnigen Verlauf der Drehkurve aufweisen würden. Wie aus den nachfolgenden Versuchsergebnissen ersichtlich ist, fanden sich beim Octopin, β -Isomer und der Mischprobe einerseits und beim Iso-octopin andererseits ganz entgegengesetzt verlaufende Kurven, indem die ersteren drei Substanzen die Kurve der l,l -Form zeigten und die letztere die der l,d -Form.

Ob diese graphische Methode allgemeine Gültigkeit beanspruchen darf, ist noch nicht entschieden, da sie bisher nur für die α -Aminosäuren nachgewiesen ist. Nimmt man jedoch an, dass diese Drehkurvenmethode auch für den vorliegenden Zweck anwendbar ist, so darf man schliessen, dass es sich bei der Konfiguration des Octopins um die l,l -Form und der des Iso-octopins um die l,d -Form handelt, wie das in den folgenden Strukturformeln dargestellt ist.



EXPERIMENTELLER THEIL.

Isolierung des Iso-octopins aus d-Arginin und d- α -Brompropionsäure.

Die Pikratlösung des Reaktionsprodukts aus d -Arginin und d - α -Brompropionsäure, welche der II. Mitteilung nach seinerzeit kein Pikrat kristallinisch geliefert hatte, wurde nach dem Entfernen der Pikrinsäure im Vakuum stark eingengt, wobei eine sirupöse Masse zurückblieb. Der Sirup wurde in 200 ccm Wasser aufgenommen, und dieser wässrigen Lösung wurden nach der Neu-

tralisation mit Schwefelsäure 20 g Flaviansäure in konz. wässriger Lösung zugesetzt. Das nach einigem Stehen ausgeschiedene Argininflavianat wurde abgenutscht und das Filtrat in gewohnter Weise mit Baryt von der Flaviansäure befreit und die freie Basenlösung im Vakuum auf eine kleine Menge eingeeengt, wobei reichlich lange, glänzende Nadeln auskristallisierten. Ausbeute 4,2 g. Nach der einmaligen Umkristallisation aus Wasser schmolz die Substanz unter Aufschäumen bei 158–159° und beim Mischen mit Octopin auch bei 158°, also ohne Depression des Mischschmelzpunkts. Die Substanz wurde nach dem Trocknen zur Gewichtskonstanz bei 110° analysiert.

3,356 mg Substanz gaben 5,365 mg CO₂ und 2,277 mg H₂O.

3,796 mg Substanz gaben 0,740 ccm N (18°, 763 mm).

Für C₉H₁₈N₄O₄ (246,2)

Ber. C 43,87% H 7,37% N 22,75%

Gef. „ 43,60 „ 7,59 „ 22,96

Optisches Verhalten.

0,3867 g Substanz, mit Wasser zu 15 ccm gelöst, zeigte im 20 cm-Rohr $\alpha = +1,33^\circ$; $[\alpha]_D^{20} = +25,77^\circ$.

Kristallwasserbestimmung.

0,6736 g Substanz erfuhr nach dem Trocknen bei 110° eine Gewichtsabnahme von 0,0831 g.

Für C₉H₁₈N₄O₄ + 2H₂O

Ber. H₂O 12,77%

Gef. „ 12,34

Pikrat.

Die wässrige Lösung der freien Base wurde mit der berechneten Menge alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt. Nach dem Eindampfen der Lösung schied sich ein Pikrat in feinen Nadeln, ähnlich wie Lactosazon, aus. Es löste sich ziemlich leicht in kaltem, sehr leicht aber in heissem Wasser, auch leicht in heissem Alkohol. Schmelzp. 198°. Eine Mischprobe mit Octopinpikrat zeigte keine

Depression des Schmelzpunkts.

*Isolierung des Iso-octopins aus d-Arginin und
dl- α -Brompropionsäure.*

Wie schon in der II. Mitteilung mitgeteilt, wurden aus 11,4 g d-Argininmonochlorhydrat und 7,6 g dl- α -Brompropionsäure 5,5 g Octopinpikrat bzw. 2,7 g freies Octopin synthetisch dargestellt. Das Filtrat vom Octopinpikrat, aus welchem sich beim Einengen nicht mehr leicht kristallisierbares Pikrat ausschied, wurde mit Äther von der Pikrinsäure befreit. Der freien Basenlösung wurden 15 g Flaviansäure, in Wasser gelöst, zugesetzt, wobei 4,4 g schwer lösliches Flavianat gewonnen wurden. Die durch Abnutschen vom Flavianat getrennte Mutterlauge wurde durch Zerlegen mit Baryt von Flaviansäure und mit Schwefelsäure vom Barium befreit und diese freie Basenlösung dann im Vakuum eingeeengt. Nach einigem Stehen schieden sich seidenglänzende, konzentrisch gruppierte Nadeln aus. Ausbeute 2,4 g. Schmelzp. 158°. Die Substanz wurde nach dem Trocknen zur Gewichtskonstanz bei 110° analysiert.

3,721 mg Substanz gaben 0,726 ccm N(18°, 763 mm).

Für $C_9H_{18}N_4O_4$

Ber. N 22,75%

Gef. „ 23,06

Spezifische Drehung.

0,3867 g Substanz, mit Wasser zu 15 ccm gelöst, zeigte im 20 cm-Rohr $\alpha = +1,33^\circ$; $[\alpha]_D^{20} = +25,77^\circ$.

Hydrolyse des Iso-octopins mit Baryt.

1,0 g Iso-octopin wurde mit einem Gemisch von 30 ccm kalt gesättigtem Barytwasser und ebensovielm Wasser 2 Stunden lang am Rückflusskühler gekocht. Darauf wurde das Hydrolysegemisch nach der Beseitigung des Bariums mit Kohlensäure im Vakuum zur Trockne eingeeengt und der Rückstand mit Alkohol wiederholt extrahiert. Der alkoholische Extrakt lieferte nach dem Abdampfen Harnstoff. Aus dem in Alkohol unlöslichen Teil liess sich aber

kein Kupfersalz kristallinisch isolieren. Daher gelang es nicht, eine der Octopinsäure isomere Substanz zu gewinnen.

Untersuchungen mit der Drehkurvenmethode.

Die Versuche wurden mit 1 Mol-Lösung angestellt. Je 0,1231 g Substanz wurde abgewogen und in 5 cm Säure- oder Alkalilösung aufgelöst. Die Mischprobe bestand aus 0,0615 g Octopin und ebensoviel Iso-octopin (kristallwasserfrei). Die Ermittlung des Drehungsvermögens erfolgte mittels des Mikropolarisationsrohrs von 20 cm Rohrlänge bei 18°.

TABELLE I.

Versuch mit Octopin.

1 Mol Octopin in Wasser	$\alpha_D = +1,06^\circ$	$[\alpha]_D^{18} = +21,0^\circ$
1 „ „ + 1/2 Mol HCl	„ 1,07	„ 21,7
1 „ „ + 1 „ „	„ 1,25	„ 2,54
1 „ „ + 5 „ „	„ 1,37	„ 27,8
1 „ „ + 10 „ „	„ 1,14	„ 23,1
1 „ „ + 1/2 „ NaOH	„ 0,92	„ 18,7
1 „ „ + 1 „ „	„ 0,87	„ 17,8
1 „ „ + 5 „ „	„ 0,87	„ 17,8

Versuch mit Iso-octopin.

1 Mol Iso-octopin in Wasser	$\alpha_D = +1,27^\circ$	$[\alpha]_D^{18} = +25,8^\circ$
1 „ „ + 1/2 Mol HCl	„ 1,19	„ 24,2
1 „ „ + 1 „ „	„ 1,05	„ 21,3
1 „ „ + 5 „ „	„ 1,22	„ 24,9
1 „ „ + 10 „ „	„ 1,61	„ 32,7
1 „ „ + 1/10 „ NaOH	„ 0,74	„ 15,1
1 „ „ + 1/2 „ „	„ 0,67	„ 13,6
1 „ „ + 1 „ „	„ 0,48	„ 9,7
1 „ „ + 5 „ „	„ 0,40	„ 8,1

TABELLE II.

Versuch mit β -Isomer.

1 Mol β -Isomer in Wasser	$\alpha_D = +1,14^\circ$	$[\alpha]_D^{18} = +23,2^\circ$
1 „ „ + 1/2 Mol HCl	„ 1,13	„ 23,1
1 „ „ + 1 „ „	„ 1,19	„ 24,2
1 „ „ + 5 „ „	„ 1,31	„ 26,6
1 „ „ + 10 „ „	„ 1,09	„ 22,2

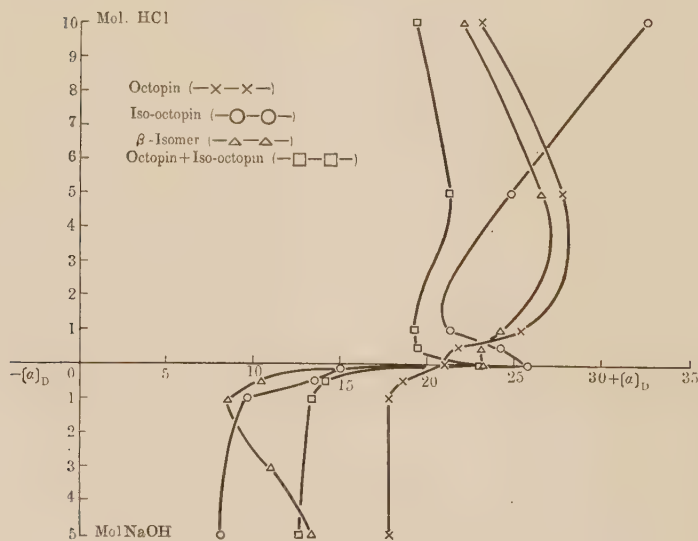
1	„	„	+ 1/2	„	NaOH	„	0,51	„	10,4
1	„	„	+ 1	„	„	„	0,42	„	8,5
1	„	„	+ 3	„	„	„	0,54	„	11,0
1	„	„	+ 5	„	„	„	0,71	„	14,4

Versuch mit Octopin+Iso-octopin.

1 Mol Probe in Wasser	$\alpha_D = +1,13^\circ$	$[\alpha]_D^{18} = +23,1^\circ$
1 „ „ + 1/2 Mol HCl	„ 0,96	„ 19,5
1 „ „ + 1 „ „	„ 0,95	„ 19,3
1 „ „ + 5 „ „	„ 1,05	„ 21,3
1 „ „ + 10 „ „	„ 0,96	„ 19,5
1 „ „ + 1/2 „ NaOH	„ 0,71	„ 14,1
1 „ „ + 1 „ „	„ 0,66	„ 13,4
1 „ „ + 5 „ „	„ 0,62	„ 12,6

Alle Daten sind in das folgende Kurvensystem eingetragen (Abb. 1).

Abb. 1.
Drehkurve.



LITERATURVERZEICHNIS.

Lutz, O. und Jirgensons, Br. (1930–1931): Ber., **63**, 448 u. **64**, 1221.

ON DETOXICATION OF NAPHTHALENE INGESTED, WITH SPECIAL REFERENCE TO A NEW URONIC ACID EXCRETED.

Preliminary Report.*

By

HAJIME MASAMUNE.

(From the Medico-chemical Institute, Hokkaido Imp. University, Sapporo.)

(Received for publication, January 12, 1937)

Previous claims were all coincident in the belief that the naphthol derived from naphthalene in the animal body is conjugated with glucouronic acid, but whether the oxidation produces α - (Lesnik, 1888), or β -naphthol (Edlefsen, 1905) or both of them (Adams, 1930) is a question yet unsettled.

Among the enumerated authors, Lesnik was the sole investigator who tried to isolate the detoxication products. In the recent work of Adams, the urine of naphthalenized rabbits was submitted to ether extraction, hydrolysis and distillation and the colour tests for α - and β -naphthols and glucuronic acid and the reduction test were made on the portions thus fractionated. His conclusion was, however, not yet decisive because isolation of compounds excreted were not attempted and moreover the Edlefsen test he employed for β -naphtholglucuronic acid could not be realised by the writer on pure specimen. The present researches were, therefore, undertaken which resulted in the following.

From the urine of naphthalenized rabbits, β -naphthol gluronic acid was not obtained at all which is less soluble in water and more in ether than is the α -naphthol derivative and would have been, for this reason, practically more readily isolated. The latter compound was obtained in one of 20 trials of preparation which succeeded and in all other cases, the excreted were found to be

* XXV. Report of "Biochemical Studies on Carbohydrates" (H. Masamune).

α -naphthol but in conjugation with a new uronic acid. While this compound shows the Penzolt-Lesnik test for α -naphtholglucuronic acid, it melted at a temperature much lower and rotated D-light in water to the right, instead of being laevorotatory. Although its chemical nature has not yet been established perfectly, it is deemed to be a penturonic acid hydrate combined with the naphthol by β -oside linkage, in so far as has been investigated, namely:

1. Analysis and the alkali titration proved that the substance obtained is composed of $C_{15}H_{18}O_8$.

2. When dissolved in water or diluted alcohol, it behaved distinctly acid to litmus and by treatment with acetanhydride and pyridine, 3 acetyl groups were introduced into the molecule.

3. By treatment with conc. HCl, no forfural was yielded.

4. Acid hydrolysis liberated α -naphthol and the remainder showed the naphthoresorcinol reaction of a carbonyl acid (Neuberg and Saneyoshi).

5. Nitrogen content of the phenylosazone of this acid and barium content of the phenylosazone salt with this metal conformed with the calculation from the formulas $C_{17}H_{18}N_4O_4$ and $C_{34}O_8H_{34}N_8Ba$.

6. The substance was cleft up by emulsin.

EXPERIMENTAL.

I. Preparation of the conjugated uronic acids from urine.

2 gm. of naphthalene were kneaded with equal quantity of glucose by means of liquid paraffine and given, wrapped in a thin wafer, each day to a rabbit. After 24 hours the urine of a group of rabbits numbering from 5 to 15 was collected, added to with saturated $Pb(CH_3-COO)_2$ solution until no more precipitation occurred. The solution obtained by filtration was neutralized with 25% ammonia, followed by adding just sufficient quantity of saturated lead subacetate solution to cast down all the precipitable substances. The deposit was then separated on a Büchner funnel, washed thoroughly with cold water and pressed.

Trials were made on the lead salts thus obtained, in order to set free the conjugated acids. In the first attempt, the portions in

two or three consecutive days were combined together and treated with many changes of ether, after being well mixed with HCl (sp. gr. 1.15), but the combined extract left only a syrupy brown residue on evaporation and only a minimal amount of crystalline substance came out on standing in contact with a little water.

In the second attempt, the lead salts were suspended in 200 to 400 cc. of water and passed with a current of H_2S , PbS collected on a Büchner funnel and washed with a large volume of cold water. The filtrate and the washings were condensed to syrupy consistency and treated repeatedly with ether after being acidified with a few cc. of fuming hydrochloric acid. The ethereal extract was then condensed and the residue kept with a small volume of water in the ice chest, while crystallization did not take place in all examples but one. The crystals gained were much less soluble in water than was the product by the procedures below and the yield of its crude product was 1.5 gm from 1500 cc. of urine. PbS mass separated and washed on the funnel was treated with boiling water and the latter was distilled in vacuo at below $40^{\circ}C$. Crystals came from the rest, on standing, but were too few to be separated.

Attempts on the above lead salts ended thus mostly in failure. As it seemed to be caused by naphthoquinone formed in the urine by air oxidation, the greyish black precipitate which was deposited by the first few cc. of lead subacetate (urine volume; 1500 cc. in averages) was thrown off in the next trials of preparation. By this minor modification, the syrupy residue of the filtrate removed from PbS could transform into a crystalline mass on evaporation, or after inoculation, when not per se on standing. It was dried on a porous plate, taken up in cold water and condensed again to crystallization after treatment with charcoal.

The mean yield per diem and per rabbit, after another repetition of the procedures, was 0.1 gm.

The purification, kindly made by Dr. S. Ayukawa, was further continued until no more elevation of melting point took place. Crystalline form: thin long needles.

It was very soluble in water, soluble in methanol, ethanol and acetone, scarcely in acetic ester and ether, and insoluble in benzene

and chloroform.

II. Identification.

A. The product less soluble in water (*a*-naphtholglucuronic acid).

The substance obtained in one of the second attempts was recrystallised four times from hot water after treatment with the animal black and dried in vacuo over P_2O_5 .

It showed the Penzolt-Lesnik sulfuric acid test for *a*-naphtholglucuronic acid, melted at 198–199°C and no lowering of the melting point was observed, when mixed with *a*-naphtholglucuronic acid (F.P. 202°C) prepared by feeding rabbits with *a*-naphthol.

Its optical rotation in water ($[\alpha]_D^{22.5} = -0.50 \times 3.0266 / 0.0253 \times 1.0036 \times 1 = -59^\circ.7$) also coincided fairly well with that of the latter ($[\alpha]_D^{22.5} = -0.78 \times 3.0296 / 0.0387 \times 1.0038^* \times 1 = -60^\circ.9$)

B. The substance more soluble in water.

It was dried constant in vacuo (< 3 mm) at 65°C over P_2O_5 . F. P., 154–156°C.

The neutral equivalent:

0.2886 mg of the substance in 5 cc. of water was titrated with 0.1 N KOH, taking phenolphthalein as an indicator. The quantity used was 8.65 cc. The neutral equivalent is accordingly

$$0.2886 \times 1000 / 0.87 = 331.7$$

The watery solution rotated D-light:

$$[\alpha]_D^{22.5} = +8.26 \times 3.1190 / 0.1153 \times 1.0138 \times 1 = +220^\circ.4$$

$$[\alpha]_D^{22.5} = +2.18 \times 3.0305 / 0.0298 \times 1.0027 \times 1 = +221^\circ.0$$

Elementar analysis:

3.394 mg substance: 6.858 mg CO_2 , 1.798 mg H_2O

3.096 mg substance: 6.101 mg CO_2 , 1.676 mg H_2O

$C_{15}H_{10}O_7 + H_2O(326)$: cal. C 55.21 H 5.52

found C 55.11, 55.00; H 5.93, 6.20.

Acetylation:

3 gm of the dried specimen were dissolved in 24 cc. of pyridine,

* The solution was oversaturated.

added to with the equal part of acetanhydride and stood at room temperature. After 60 hours, 6 cc. of water were poured in small portions into the ice cooled solution and again stood for 2 hours. The mixture was next evaporated to dryness in vacuo at 40°C, and in order to remove pyridine as completely as possible, dissolution in methanol and evaporation were repeated several times and the final residue was kept in a vacuum dessicator over sulfuric acid for a few days. On standing its solution in the smallest possible volume of methanol, with a few drops of water, colourless spindle shaped crystals appeared. After separation and recrystallization from the same solvent, they were dried to a constant weight in vacuo over P_2O_5 at room temperature. Yield, 0.5 gm.

The substance sintered at 135° and melted at 145°C and behaved acid to litmus in dilute alcohol.

3.920 mg substance: 8.251 mg CO_2 1.978 mg H_2O

$C_{15}H_{13}O_7(COCH_3)_3$: calc. C 58.1 H 5.1,

found C 57.4 H 5.7.

The number of the acetyl radicle was estimated by addition of excess of 0.2 *n.* NaOH to the alcoholic solution of it (ca. 1%) and backtitration with 0.02 *n.* H_2SO_4 after the lapse of 20–40 hours at room temperature, employing phenolphthalein as an indicator. 3.20, 2.07, 2.30 and 2.28 cc. of 0.2 *n.* NaOH were found neutralized by 65.9, 44.4, 48.4 and 48.9 mg of the substance respectively, namely, 1.96, 2.02, 2.06 and 2.02 cc. by 43.4 mg. When 3 acetyl radicles are assumed to be present, the volume calculated is 2.0 cc.

Test for furfural production.

82.2 mg of the substance was taken and treated with fuming hydrochlorid acid by following the procedures which Ozaki described (heating: 40 min.), but no discrepancy was observed between the blank and the main runs in titration of the distillates.

α-Naphthol as one constituent.

Hydrolysis of the substance was prosecuted by heating 1 gm. of the substance with 20 cc. of 1 *n.* H_2SO_4 under reflux (ground joint) in the boiling water. Glistening needles began to come out shortly. At the 7th hour from the commencement, the mixture was cooled and the crystals deposited were collected on a Hirsh

funnel, washed with water, and dried in vacuo (<3 mm) over P_2O_5 . After recrystallisation from hot water, the $FeCl_3$ test and the alkaline iodine test for α -naphthol were positive. F.P., $94^\circ C$. The identification was further established by determination of the mixed melting point.

Phenylosazone of the penturonic acid.

The mother liquor and the washings in the above experiment were passed in a continuous extractor with a current of ether until the Penzolt-Lesnik reaction was not demonstrated anymore (5 hours). Ether was expelled, H_2SO_4 removed with exactly equivalent quantity of saturated $Ba(OH)_2$ solution and the filtrate was condensed under reduced pressure at a low temperature. The residue reduced the Fehling solution intensively. As no crystallisation occurred, it was redissolved in 10 cc. of water and heated in the boiling bath with 1 cc. of 2 *n.* acetic acid and 0.5 cc. of phenylhydrazine, whereupon yellow crystals in thin needles precipitated out of the solution shortly. Heating was continued for 15 minutes and the deposited mass was collected and washed with water exhaustively. Purification was performed by repetition of the above procedures. The substance, dried in vacuo over P_2O_5 , turned red at $118^\circ C$ and melted at 120 – $122^\circ C$ under gas evolution. It was slightly soluble in water and alcohol and scarcely in ether.

5.272 mg substance: 0.761 cc (761 mm, $23^\circ C$) N

$C_{17}H_{18}N_4O_4$ (342): found N 16.66,
 cal. N 16.37.

The barium salt of the uronic acid osazone: The equal amount of the conjugated acid was treated similarly and the rest evaporated was dissolved in 10 cc. of water, added to with 5 cc. of 2 *n.* acetic acid, 5 cc. of barium acetate solution containing 0.54 gm. and 1 cc. of phenylhydrazine. After being kept in a boiling bath for the same duration as above, the mixture was cooled and the crystals of the salt were collected on a filter, and washed thoroughly with water, hot alcohol and finally with ether. The substance obtained was greenish yellow, slightly soluble in alcohol and water and insoluble in ether. On heating, it charred gradually and melted at $211^\circ C$.

5.254 mg substance: 1.501 mg BaSO₄
C₃₄H₃₄N₅O₈Ba (819.7): cal. Ba 16.76,
found Ba 16.86.

EMULSIN EXPERIMENT.

32 mg of the conjugated acid, dissolved in 1 cc. of 0.1 *n*. NaOH, were mixed with 2 cc. of emulsin (E. Merck) solution involving 20 mg and 2 cc. of citrate buffer solution at pH 4, and kept in an incubator at 38°C, with one drop of toluene. As the control experiment, the substance was replaced by the equal amount of α -naphtholglucuronic acid. After incubation of 10 hours, the mixtures were cooled under the tap, neutralized each with 1 cc. of 0.2 *n*. NaOH, and deproteinized with 4 cc. of 5.3% phosphortungstic acid. The filtrate was then passed with a current of ether in the continuous extractor for 1 hour and the reduction power on ferricyanide was estimated on 2 cc. of the liquor, after removal from ether, by the procedures described formerly by the writer (1933). 0.52 cc. of 0.005 *n*. ferricyanide solution was used in the run with the new compound, while 1.1 cc. in case of α -naphthol glucuronic acid.

The fact suggests that the substance under investigation belongs to β -oside.

SUMMARY.

β -Naphtholglucuronic acid was not detected in urine of naphthalenized rabbits. α -naphtholglucuronic acid was isolated, but merely in one trial of preparation and in all others, which succeeded (the third method) a new compound, α -naphthol-penturonic acid hydrate.

The writer owes the elementar analyses to Dr. S. Umezawa, Assistant of Professor H. Suginome in the Chemical Institute.

REFERENCES.

- Adams, D. R. (1930): Brit. Jour. of Ophthalmol., **14**, 545.
Edlefsen, G. (1905): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., **52**, 429.
Lesnik, M. (1888): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., **24**, 167.
Masamune, H. (1933): Jour. of Biochem., **18**, 259.
Ozaki, G. (1936): Jour. of Biochem., **24**, 73.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN PARTIELLEN ABBAU DER PROTEINE.

II. Mitteilung. Partielle Spaltung des Gliadins.

VON

TARO KUNISHIGE.

*(Aus der sechsten Forschungsabteilung (Biochemie) des Institutes für
Infektionskrankheiten, Kaiserliche Universität zu Tokyo.
Vorstand der Abteilung: Assist. Prof. Dr. T. Uchino.)*

(Eingegangen am 30. Januar 1937)

EINLEITUNG.

Um Einblick in die Struktur der Proteine zu gewinnen hat Uchino in der ersten Mitteilung (1934) das Seidenfibroin unter verschiedenen Bedingungen stufenweise hydrolysiert. Er hat einerseits die dabei entstehenden Abbauprodukte in eine Reihe von Fraktionen getrennt und sie inbezug auf ihre chemische Zusammensetzung und ihr Mengenverhältnis miteinander verglichen, andererseits verfolgte er die mit dem Fortschreiten der Spaltung vor sich gehenden Veränderungen der Bindungsweise der Aminosäuren. Aus seinen Versuchsergebnissen wurden die folgenden Schlüsse gezogen: die Proteine erfahren ihre Aufspaltung zuerst nur unter einer Hydrolyse bei Gegenwart einer genügenden Menge Wassers, indem ihre langen Polypeptidketten in einfachere Peptiden zerlegt werden. Bei Abwesenheit der genügenden Menge Wassers schreitet der Abbau sehr langsam fort. Die auf diese Weise durch Hydrolyse entstehenden Peptiden wandeln sich dann einerseits unter geeigneten Bedingungen durch Anhydrierung in Diketopiperazine um, andererseits werden sie durch weitere Hydrolyse zu freien Aminosäuren gespalten. Das Mengenverhältnis der Peptiden, Diketopiperazine und freien Aminosäuren hängt vorwiegend von der verwendeten Säure- und Alkalikonzentration ab. Nach diesem Resultat hat Uchino angenommen, dass die bisher aus den Eiweissabbauprodukten isolierten Anhydride sehr

wohl beim Spaltungsvorgang sekundär entstandene Kunstprodukte sind und dass die Proteine in der Hauptsache aus säureamidartig verknüpften Aminosäuren zusammengesetzt sind.

Im Anschluss an Uchino wurde die vorliegende partielle Spaltung des Gliadins unternommen. Das hier verwendete Gliadin besteht annähernd zur Hälfte aus Diaminosäuren, fast ausschliesslich Glutaminsäure, und daneben ist auch ca. 10 Proz. Prolin enthalten, während das von Uchino verwendete Seidenfibroin vorwiegend aus einigen Monoaminosäuren zusammengesetzt ist.

Die Versuchsmethodik ist im grossen und ganzen die gleiche wie sie Uchino zuvor mitgeteilt hat. Es sei diesbezüglich auf seine Arbeit hingewiesen.

I. DARSTELLUNG DES GLIADINS.

Das Gliadin wurde nach der Vorschrift von Th. B. Osborne und E. Strauss (1921) aus Weizengluten dargestellt. Das erhaltene Gliadin stellt weisses Pulver dar und enthält 15.64–15.88 Proz. Stickstoff.

II. SPALTUNG DES GLIADINS DURCH VERDÜNNTE SCHWEFEL-SÄURE UND NATRONLAUGE.

Zuerst wurde der Verlauf der Hydrolyse des Gliadins bei 170°, unter wechselnder Säure- und Alkalikonzentration und bei verschiedener Erhitzungsdauer zeitlich verfolgt.

a) *Spaltung durch Schwefelsäure.*

5 g Gliadin wurden mit der 10 fachen Menge 0.10, 0.15 oder 0.20 n-Schwefelsäure im Autoklaven auf 170° erhitzt. Im Interval von je 2½ Stunden wurde eine Probe aus dem Reaktionsgemisch entnommen, filtriert und mit verdünnter Natronlauge gegen Methylrot neutralisiert. In dieser Lösung wurde es auf Biuretreaktion geprüft und der Gesamt-, Amino- und Ammoniakstickstoff bestimmt. In dieser Weise wurde das Prozent des Amino- oder Ammoniakstickstoffes zum Gesamtstickstoff in der Versuchslösung zeitlich verfolgt. Der Gesamtstickstoff wurde mittels Mikrokjeldahlmethode, der Aminostickstoff nach der Methode

von Linderström-Lang (1928) und das Ammoniak nach Folin bestimmt.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle I und Fig. 1 zusammengestellt.

TABELLE I.

Spaltung des Gliadins mit verdünnter Schwefelsäure bei 170°.

a) Spaltung mit 0.10 n-Schwefelsäure.

Versuchsdauer (Stunden)	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion
3h	33.92	21.08	+
5h	38.57	25.89	+
7h 30'	42.35	26.21	+
10h	43.84	26.40	schwach
12h 30'	44.76	27.63	—

b) Spaltung mit 0.15 n-Schwefelsäure.

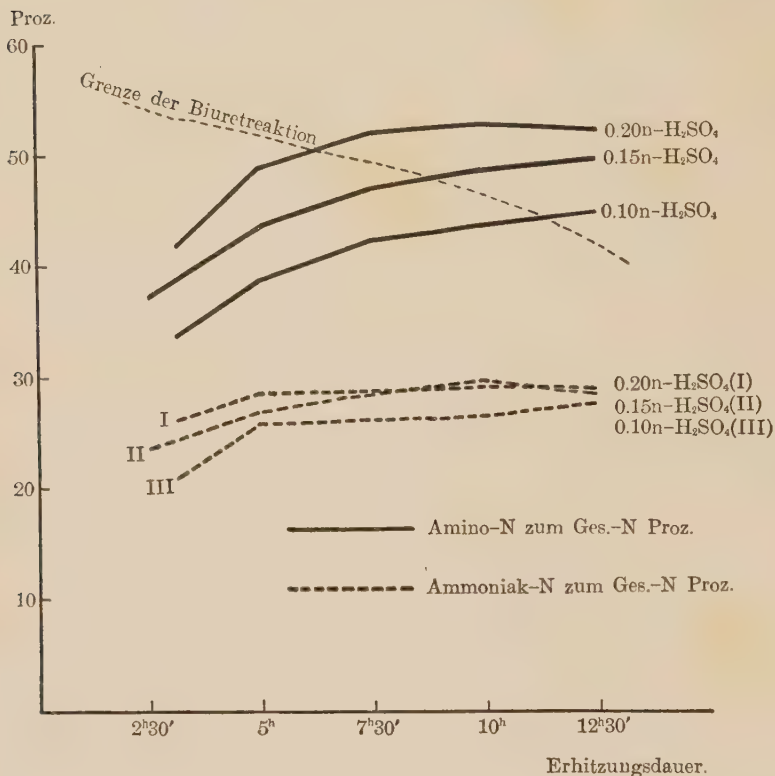
Versuchsdauer (Stunden)	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion
2h 30'	37.42	23.72	+
5h	43.78	27.03	+
7h 30'	47.24	28.63	schwach
10h	48.91	29.82	—
12h 30'	49.74	28.63	—

c) Spaltung mit 0.20 n-Schwefelsäure.

Versuchsdauer (Stunden)	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion
3h	46.82	26.40	+
5h	48.88	28.66	schwach
7h 30'	52.08	28.79	—
10h	52.74	29.39	—
12h 30'	52.10	28.93	—

Fig. 1.

Spaltung des Gliadins mit verdünnter Schwefelsäure bei 170°.



Nach 2½ stündigem Erhitzen bleibt ein kleiner Teil des Gliadins noch ungelöst zurück. Bei fortgesetztem Erhitzen geht es vollständig in Lösung. Es tritt dennoch alsbald ein schwarzbrauner Niederschlag auf, dessen Menge mit der Zeit zunimmt. Zugleich färbt sich die Lösung gelbbraun. Aus der Tabelle I und Fig. 1 kann man ersehen, dass die Biuretreaktion um diejenige Zeit verschwindet, in der der Aminostickstoffwert sich auf 45–50 Proz. steigert und der Ammoniakstickstoff 28–29 Proz. erreicht. Es zeigte sich ferner, dass das Ammoniak nach 5 Stunden nahezu vollständig aus Glutamin abgespalten wird.

b) *Spaltung durch Natronlauge.*

Die Versuchsmethodik ist die gleiche wie im vorangehenden Versuch. Nur wurde 0.05, 0.10, 0.15 und 0.20 n-Natronlauge verwendet an Stelle der Schwefelsäure. Das Resultat ist in der Tabelle II und Fig. 2 zusammengestellt.

TABELLE II.

Spaltung des Gliadins mit verdünnter Natronlauge bei 170°.

a) Spaltung mit 0.05 n-Natronlauge.

Versuchsdauer (Stunden)	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion
2h 30'	19.42	10.69	+
5h	25.78	15.25	+
7h 30'	29.88	18.85	+
10h	34.97	20.74	schwach
12h 30'	36.63	23.20	sehr schwach

b) Spaltung mit 0.10 n-Natronlauge.

Versuchsdauer (Stunden)	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion
2h 30'	18.78	7.73	+
5h	27.05	11.92	+
7h 30'	32.87	14.50	+
10h	38.90	19.54	+
12h 30'	41.30	18.62	schwach

c) Spaltung mit 0.15 n-Natronlauge.

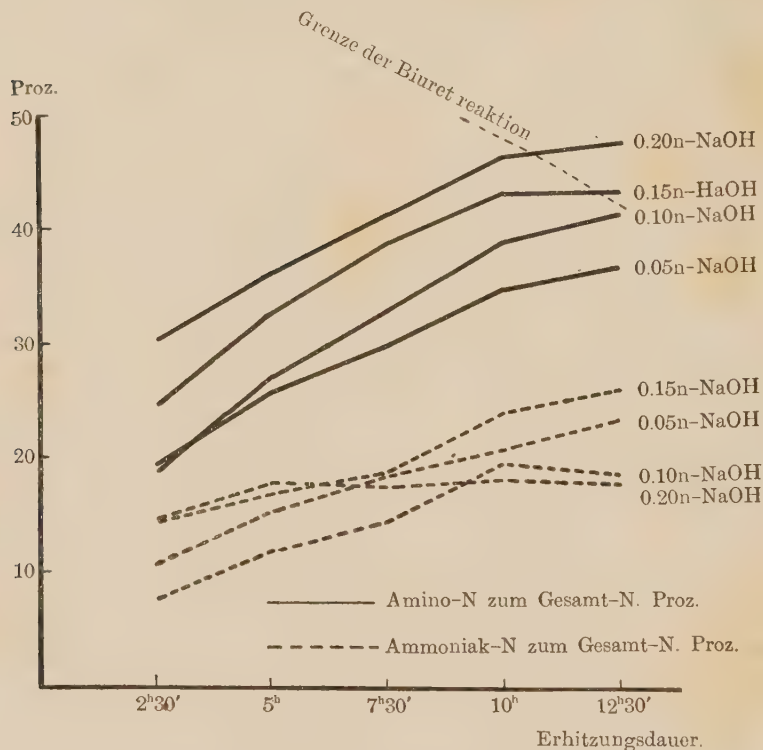
Versuchsdauer (Stunden)	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion
2h 30'	24.71	14.35	+
5h	32.57	16.93	+
7h 30'	38.75	18.56	+
10h	43.17	23.92	schwach
12h 30'	42.92	26.20	—

d) Spaltung mit 0.20 n-Natronlauge.

Versuchsdauer (Stunden)	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion
2h 30'	30.31	14.56	+
5h	36.20	17.86	+
7h 30'	41.38	17.72	+
10h	46.17	18.17	schwach
12h 30'	47.43	17.80	—

Fig. 2.

Spaltung des Gliadins mit verdünnter Natronlauge bei 170°.



Im Falle der Alkalispaltung geht das Gliadin schon nach 2½ Stunden vollständig in Lösung. Es treten kaum Niederschläge auf, wie bei der Säurespaltung. Ferner lässt sich eine beträchtliche Abnahme der Alkalinität der Lösung erkennen. Bei der Spaltung mit 0.05 n-Natronlauge reagiert die Lösung nach 12½ Stunden sehr schwach alkalisch oder sogar sauer gegen Lackmuspapier. Dieser Umstand beruht darauf, dass durch Alkalibehandlung das Ammoniak aus Glutamin in Freiheit gesetzt wird, das teils aus der Lösung entweicht, und die Natronlauge durch Dicarbonsäure neutralisiert wird. Daraus folgt, dass das Reaktionsgemisch mehr oder weniger stark nach Ammoniakgas riecht und der Ammoniak-

gehalt der Lösung stets niedriger gefunden wird als bei der Säurespaltung. Die Biuretreaktion bleibt etwas länger bestehen als im Falle der Säurebehandlung. Es zeigte sich ferner, dass bei der Spaltung mit 0.05 n-Natronlauge, wobei das Hydrolysat schliesslich fast neutral reagiert, die Biuretreaktion sich schneller abschwächt als sonst.

Um den Verlauf der Säure- und Alkalisspaltung miteinander zu vergleichen muss der Umstand, dass bei der Alkalisspaltung ein Teil des Ammoniaks aus der Lösung entweicht, nicht ausser acht gelassen werden. Zu derartigem Zwecke kann man sich vorteilhaft auf den Prozentwert des Aminostickstoffes zum Non-Ammoniakstickstoff (Gesamt-N—Ammoniak-N) beziehen. In der Tabelle III und Fig. 3 sind die berechnete Prozentwerte des Aminostickstoffes zum Non-Ammoniakstickstoff zusammengestellt.

TABELLE III.

Amino-N zum Non-Ammoniak-N (Gesamt-N—Ammoniak-N) Proz.

a) Spaltung des Gliadins mit verdünnter Schwefelsäure.

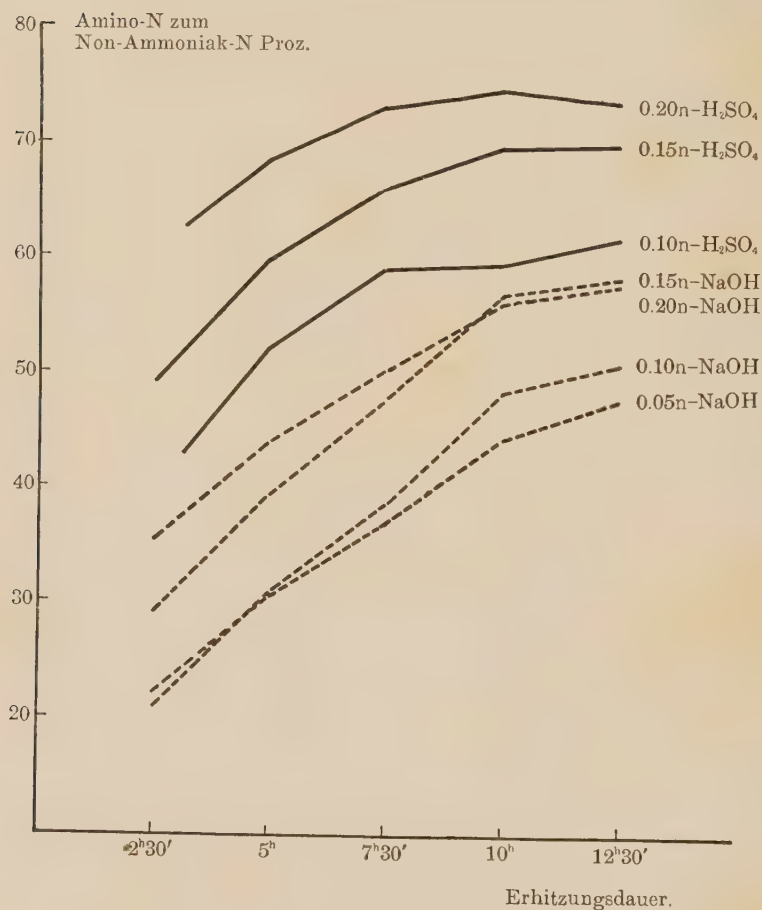
Versuchsdauer (Stunden)	0.10 n- Schwefelsäure	0.15 n- Schwefelsäure	0.20 n- Schwefelsäure
2h 30'	42.98(3h)	49.06	62.82(3h)
5h	52.04	59.99	68.50
7h 30'	59.21	66.16	73.11
10h	59.29	69.66	74.69
12h 30'	61.84	69.68	73.28

b) Spaltung des Gliadins mit verdünnter Natronlauge.

Versuchsdauer (Stunden)	0.05 n- Natronlauge	0.10 n- Natronlauge	0.15 n- Natronlauge	0.20 n- Natronlauge
2h 30'	21.74	20.83	28.85	35.48
5h	30.43	30.71	39.21	44.67
7h 30'	36.82	38.44	47.56	50.29
10h	44.13	48.43	56.74	56.41
12h 30'	47.69	50.75	58.15	57.72

Fig. 3.

Spaltung des Gliadins mit verdünnter Schwefelsäure
und Natronlauge bei 170°.



Uchino hat gezeigt, dass die Spaltung des Seidenfibroins durch Alkali viel schneller erfolgt als die durch Säure. Im Gegensatz dazu kann man aus dem Fig. 3 ersehen, dass bei der Hydrolyse des Gliadins die Säurespaltung viel schneller stattfindet als die Alkalispaltung. Die Ursache hiervon liegt sicherlich darin, dass im letzteren Falle die Alkalinität der Lösung mit fortschreitender

Hydrolyse beträchtlich abnimmt. Es muss noch bemerkt werden, dass die Aminostickstoffkurven wenig geneigt sind auf der niedrigen Abbaustufe den konstanten Wert zu zeigen, wie im Falle des Seidenfibroins (vgl. Uchino, 1934). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Menge des gebildeten Diketopiperazins verhältnismässig klein bleibt.

III. FRAKTIONIERUNG DER ABBAUPRODUKTE DES GLIADINS.

Um das Mengenverhältnis der bei der Aufspaltung des Gliadins mit Säure und Alkali entstehenden Aminosäuren, Peptiden und Diketopiperazine in Klarheit zu setzen, wurde das Gliadin mit der 10 fachen Menge verdünnter Säure oder Alkali wechselnder Konzentration hydrolysiert. Die entstehenden Abbauprodukte wurden dann in eine Reihe von Fraktionen zerlegt und die chemische Zusammensetzung einzelner Fraktionen ermittelt. Im folgenden ist das Ergebnis der Fraktionierung derjenigen Abbauprodukte erwähnt, welche durch Hydrolyse mit 0.10 n-Schwefelsäure entstanden sind.

Das verwendete Gliadin enthielt 15.65 Proz. Stickstoff. 60 g wurden mit der 10 fachen Menge 0.10 n-Schwefelsäure im Autoklaven 10 Stunden lang auf 170° erhitzt. Das Hydrolysat zeigte noch schwach die Biuretreaktion. Der von der Lösung abgetrennte schwarzbraune Rückstand wog 1.60 g. Die Lösung wurde vorsichtig mit 1 n-Natronlauge neutralisiert und im Flüssigkeitsextraktor nach Kumagawa-Suto 33–35 Stunden ausgezogen.

Essigätherauszug: Am Gefässboden schied sich aus der Essigätherlösung braunschwarze huminartige Masse. Sie ist kaum löslich in Mineralsäuren, wohl aber in Natronlauge. Der beim Abdampfen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand der Essigätherlösung wurde in grösser Menge heissen Wassers gelöst, unter Zusatz von Tierkohle ausgekocht und filtriert. Das Filtrat wurde auf kleines Volumen eingeeengt und im Eisschrank stehen gelassen. Es schied sich dabei weisser Niederschlag aus, welcher nach einem Tage abfiltriert und mit Wasser gewaschen wurde. Der Niederschlag wurde Fraktion A genannt. Die Ausbeute betrug 0.422 g und der Stickstoffgehalt 11.20 Proz.. Diese Fraktion zeigt weder

Biuret- noch Millonsche Reaktion und stellt ein schwer mit Wasser zu benetzendes Pulver dar. Es sublimiert ausserordentlich leicht und gibt mit gesättigter alkoholischer Pikrinsäurelösung und 1 n-Natronlauge schon in der Kälte tiefrote Carbonylreaktion nach Sasaki (1921). Das aus Wasser umkrystallisierte Produkt schmilzt im geschlossenen Röhrchen bei 263°.

0.0371g Substanz gaben 0.0861g CO₂ und 0.0330g H₂O.

Für C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	Ber.	Gef.
	C 63.59%	C 63.29%
	H 9.81 %	H 9.95 %
	N 12.39%	N 12.18%

(Nach der Mikrokjeldahlmethode bestimmt).

Die Analysenergebnisse sprechen dafür, dass hier Leucinimid vorliegt.

Das von der Fraktion A abgetrennte Filtrat (Fraktion B) zeigt stark die Carbonylreaktion. Die Biuretreaktion fällt negativ aus. Der Aminostickstoff beträgt 0.45 Proz. des Gesamtstickstoffes und der Ammoniakstickstoff 0.62 Proz. Diese Fraktion scheint fast ausschliesslich aus Diketopiperazinen zu bestehen. Zur Bestimmung einzelner Aminosäuren, welche in dieser Fraktion enthalten sind, wurde ein aliquoter Teil mit 5 n-Schwefelsäure 17–18 Stunden hydrolysiert. Die Schwefelsäure wurde mit Baryt entfernt und der Barytniederschlag mehrmals mit Wasser gewaschen. Das Filtrat und Waschwasser wurden dann eingeeengt und in einem Messkolben auf bestimmtes Volumen gebracht. Aus dieser Lösung wurde die Diaminosäuren als Bariumsalz nach der Methode von D. B. Jones and O. Moeller (1928) abgeschieden. Da im Gliadin nur verschwindend kleine Menge von Asparaginsäure enthalten ist, kann man annähernd das erhaltene Bariumsalz als das der Glutaminsäure betrachten. Das Prolin wurde nach der Methode von M. Bergmann (1935) in Form seines Rhodanilinsäuresalzes abgeschieden. Das Ergebnis der Analyse zeigt, dass in der Fraktion B das Prolin-N 14.82 Proz., das Glutaminsäure-N 12.37 Proz. des Gesamtstickstoffes beträgt. Das Arginin liess sich als sein Flavianat nicht nachweisen. Es ist anzunehmen, dass in der

Fraktion B eine Reihe von Anhydriden enthalten sind, an deren Aufbau sich Prolin, Glutaminsäure und andere Aminosäuren beteiligt sind. Die Isolierung und chemische Kennzeichnung einzelner Diketopiperazine sind im Gang.

Die Restlösung der Essigätherextraktion zeigte sehr schwache Carbonylreaktion. Auch die Biuretreaktion fiel negativ aus. Diese Fraktion scheint der Hauptmenge nach aus Dipeptiden und freien Aminosäuren zu bestehen. Zur weiteren Fraktionierung wurde sie auf kleines Volumen eingeeengt und mit der 8 fachen Menge absoluten Alkohols versetzt. Dabei schied sich weisser krystallinischer Niederschlag ab, welcher nach einem Tage abgesaugt, mit Alkohol (8:1) gewaschen und getrocknet wurde. Die Ausbeute betrug 3.70 g. Diese Fraktion (Fraktion C) weist weder Biuret- noch Carbonylreaktion auf und besteht weitaus zum grössten Teile aus anorganischen Salzen. Der Ammoniakstickstoff macht etwa 80 Proz. des Gesamtstickstoffes aus. In dieser Fraktion ist die Bestimmung des Aminostickstoffes durch gewöhnliche Methoden nicht auszuführen, da es eine grosse Menge von Ammoniumsalz und Natriumsulfat enthält. Das erstere schädigt die Methode von Van Slyke und das letztere diejenige von Linderström-Lang.

Die von der Fraktion C abfiltrierte alkoholische Lösung wurde Fraktion D genannt. Sie zeigte schwach die Biuretreaktion. Ein Teil derselben wurde bis zum Sirup eingeeengt, in 1 n-Schwefelsäure gelöst und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der durch diese Säure fällbare Anteil (Fraktion D₁) weist Biuretreaktion auf. Der Prozentsatz des Aminostickstoffes zum Gesamtstickstoff betrug 28.16 Proz. Diese Fraktion scheint ein Gemisch von Peptiden und basischen Aminosäuren darzustellen. Daneben ist auch Ammoniumsalz enthalten. In dem durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Anteil machte der Aminostickstoff 95.35 Proz. des Gesamtstickstoffes aus. Die Biuretreaktion fiel negativ aus. Daraus ergibt sich dass diese Fraktion (D₂) vorwiegend aus freien Aminosäuren besteht.

Die Fraktionen C, D₁ und D₂ wurden in gleicher Weise, wie oben dargelegt, hydrolysiert und die Verteilung der Aminosäuren ermittelt.

TABELLE IV.
Stickstoffverteilung in den Abbauprodukten des Gliadins. 10 stündige
Spaltung von 60 g Gliadin mit 0.10 n-Schwefelsäure bei 170°.

	Ausbeute	$\frac{\text{Amino-N}}{\text{Gesamt-N}}$	$\frac{\text{Ammoniak-N}}{\text{Gesamt-N}}$	Aminosäureverteilung		a) Biuretreaktion b) Carbonylreaktion c) Millon'sche Reaktion
				$\frac{\text{Glutaminsäure-N}}{\text{Gesamt-N}}$	$\frac{\text{Prolin-N}}{\text{Gesamt-N}}$	
Hydrolysat	8.720 g als N	43.89%	29.14%			a) + b) + c) +
	0.1731 g als N					a) — b) — c) ±
	0.422 g (N = 11.20%) schwer löslicher Teil					a) — b) + c) +
	0.737 g als N	0.45%	0.62%	12.37%	14.82%	a) — b) + c) +
Restlösung der Essigätherextraktion	7.943 g als N	52.82%	29.72%			a) + b) — c) ±
	3.70 g (N = 19.55%) 0.723 g als N		79.34%	5.34%	0	a) — b) —
C { In Alkohol schwer löslicher Teil der Restlösung	Von der Fraktion C abgetrennte alkoholische Lösung	7.034 g als N	44.58%	17.02%		a) + b) ± c) —
D { Durch Phosphorwolframsäure fällbarer Teil der Fraktion D		2.527 g als N	28.16%	24.32%	5.26%	a) + b) ± c) +
D ₁ { Durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Teil der Fraktion D	Durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Teil der Fraktion D	2.192 g als N	95.35%	2.79%	0	a) — b) — c) —
D ₂ {		1.60 g (N = 10.00%) 0.160 g als N				
Rückstand						

Das Resultat der Fraktionierung der durch Spaltung mit 0.10 n-Schwefelsäure entstehenden Abbauprodukte ist in der Tabelle IV zusammengestellt.

Auf gleiche Weise wurde das Gliadin mit 0.15 und 0.20 n-Schwefelsäure, sowie mit 0.10, 0.15 und 0.20 n-Natronlauge aufgespalten, die entstehenden Abbauprodukte in eine Reihe von Fraktionen zerlegt, und die Stickstoffverteilung in einzelnen Fraktionen ermittelt. Die Resultate sind, einschliesslich der von Tabelle IV, in Tabelle V zusammengestellt.

Aus der Tabelle V kann man ersehen, dass die Fraktionen A und B, welche durch Extraktion der Hydrolysenflüssigkeit mit Essigäther gewonnen wurden, aus Diketopiperazinen bestehen, und dass die Anhydride unter den Abbaufractionen fast ausschliesslich nur in diesen zwei Fraktionen auftreten. Die Fraktion C, die durch Fällung mit Alkohol erhalten wurde, besteht grösstenteils aus anorganischen Salzen. In derselben sind daneben kleine Mengen von Peptiden und freien Aminosäuren vorhanden. Die Fraktion D₁ stellt ein Gemisch von durch Phosphorwolframsäure fällbaren Peptiden und basischen Aminosäuren sowie Ammoniumsalzen dar, während die Fraktion D₂ der Hauptmenge nach aus freien Aminosäuren und zwar vorwiegend aus Glutaminsäure besteht. Aus diesen Tatsachen ergibt sich, dass das Mengenverhältnis der Fraktionen (A + B), (D₁—Ammoniumsalz) und D₂ in den Abbauprodukten im grossen und ganzen dasjenige von Diketopiperazinen, Peptiden und freien Aminosäuren angibt. Um einen diesbezüglichen Überblick zu erhalten ist in der folgenden Tabelle VI die Stickstoffverteilung in diesen drei Fraktionen gezeigt. Die Zahlen in Klammern zeigen die Prozentwerte bezogen auf den Gesamtstickstoff des zur Spaltung verwendeten Gliadins.

Aus der Tabelle VI ergibt sich, dass bei der Spaltung mit Säuren eine grössere Menge von Diketopiperazinen auftritt, als bei der mit Natronlauge. Die Ausbeute an Anhydriden war bei der Spaltung mit 0.15 n-Schwefelsäure am grössten und betrug 14.35 Proz. des in dem verwendeten Gliadin enthaltenen Stickstoffes. Demgegenüber liess sich im Falle der Alkalispaltung eine grössere Menge von Peptiden nachweisen. Diese Resultate stimmen gut

TABELLE V.

Stickstoffverteilung in den Abbauprodukten des Gliadins. 10 stündige Spaltung von 60 g Gliadin mit 0.10, 0.15 und 0.20 n-Schwefelsäure sowie 0.10, 0.15 und 0.20 n-Natronlauge bei 170°.

a) Biuretreaktion, b) Carbonylreaktion, c) Millonsche Reaktion.

Fraktionen	Säure- und Alkalikonzentration	0,10 n-Schwefelsäure		
Hydrolysat		8.720 g als N Amino-N/Ges.-N 43.89% Ammoniak-N/Ges.-N 29.14%		a) + b) + c) +
Essigätherauszug	Harzige Masse	0.1731 g als N		a) - b) - c) ±
	A In Wasser schwer löslicher Teil	(0.422 g) 0.0473 g als N Gesamt-N 11.20%		a) - b) + + + c) -
	B In Wasser löslicher Teil	0.737 g als N Amino-N/Ges.-N 0.45% Ammoniak-N/Ges.-N 0.62%		a) - b) + + + c) +
		Glutaminsäure-N 12.37% Prolin-N 14.82%		
Restlösung der Essigätherextraktion		7.943 g als N Amino-N/Ges.-N 52.82% Ammoniak-N/Ges.-N 29.72%		a) + + b) - c) ±
C In Alkohol schwer löslicher Teil der Restlösung		(3.70 g) 0.723 g als N Gesamt-N 19.55% Ammoniak-N/Ges.-N 79.34% Glutaminsäure-N 5.34% Prolin-N 0		a) - b) -
D Von der Fraktion C abgetrennte alkoholische Lösung		7.034 g als N Amino-N/Ges.-N 44.58% Ammoniak-N/Ges.-N 17.02%		a) + + b) ± c) -
D ₁ Durch Phosphorwolframsäure fällbarer Teil der Fraktion D		2.527 g als N Amino-N/Ges.-N 28.16% Ammoniak-N/Ges.-N 24.32% Glutaminsäure-N 21.17% Prolin-N 5.26%		a) + b) ± c) +
D ₂ Durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Teil der Fraktion D		2.192 g als N Amino-N/Ges.-N 95.35% Ammoniak-N/Ges.-N 2.79% Glutaminsäure-N 59.03% Prolin-N 0		a) - b) - c) -
Rückstand		(1.60 g) 0.160 g als N Gesamt-N 10.00 %		

TABELLE V.—(Fortsetzung).

Fraktionen	Säure- und Alkalikonzentration	0.15 n-Schwefelsäure	
Hydrolysat		8.945 g als N	a) —
		Amino-N/Ges.-N 46.76%	b) +
		Ammoniak-N/Ges.-N 29.24%	c) +
Essigätherauszug	Harzige Masse	0.216 g als N	a) — b) ± c) ±
	A In Wasser schwer löslicher Teil	(0.828 g) 0.0984 g als N Gesamt-N 11.88%	
	B In Wasser löslicher Teil	1.247 g als N Amino-N/Ges.-N 0.05% Ammoniak-N/Ges.-N 0.35%	a) — b) + + + c) +
	Restlösung der Essigätherextraktion	7.619 g als N Amino-N/Ges.-N 54.78% Ammoniak-N/Ges.-N 34.57%	a) — b) ± c) ±
C In Alkohol schwer löslicher Teil der Restlösung		(5.90 g) 0.7681 g als N Gesamt-N 13.02% Ammoniak-N/Ges.-N 79.11%	a) — b) —
	D Von der Fraktion C abgetrennte alkoholische Lösung	6.540 g als N Amino-N/Ges.-N 52.28% Ammoniak-N/Ges.-N 23.81%	a) + b) ± c) ±
D ₁ Durch Phosphorwolframsäure fällbarer Teil der Fraktion D		1.796 g als N Amino-N/Ges.-N 42.27% Ammoniak-N/Ges.-N 47.75%	a) + b) — c) +
		Glutaminsäure-N 20.30%	
D ₂ Durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Teil der Fraktion D		2.485 g als N Amino-N/Ges.-N 94.69% Ammoniak-N/Ges.-N 1.15%	a) — b) — c) —
		Glutaminsäure-N 66.49% Prolin-N 0	
Rückstand		(2.15 g) 0.211 g als N Gesamt-N 9.83%	

TABELLE V.—(Fortsetzung).

Fraktionen	Säure- und Alkalikonzentration	0.20 n-Schwefelsäure		
Hydrolysat		8.962 g als N Amino-N/Ges.-N 53.14% Ammoniak-N/Ges.-N 28.11%		a) —
Essigätherauszug	Harzige Masse			a) — b) — c) ±
	A In Wasser schwer löslicher Teil	(0.866 g) 0.1012 g als N Gesamt-N 11.68%		b) + + +
	B In Wasser löslicher Teil	1.042 g als N Amino-N/Ges.-N 0 Ammoniak-N/Ges.-N 0.25%		a) — b) + + + c) +
		Glutaminsäure-N 6.65% Prolin-N 16.16%		
Restlösung der Essigätherextraktion		7.902 g als N Amino-N/Ges.-N 57.73% Ammoniak-N/Ges.-N 29.38%		a) — b) — c) +
C In Alkohol schwer löslicher Teil der Restlösung		(8.65 g) 0.8622 g als N Gesamt-N 9.97% Ammoniak-N/Ges.-N 82.19%		a) — b) — c) —
D Von der Fraktion C abgetrennte alkoholische Lösung		6.403 g als N Amino-N/Ges.-N 51.75% Ammoniak-N/Ges.-N 19.70%		a) ± b) ± c) ±
D ₁ Durch Phosphorwolframsäure fällbarer Teil der Fraktion D		1.637 g als N Amino-N/Ges.-N 32.68% Ammoniak-N/Ges.-N 53.42%		a) ± b) — c) +
		Glutaminsäure-N 18.85%		
D ₂ Durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Teil der Fraktion D		2.423 g als N Amino-N/Ges.-N 97.18% Ammoniak-N/Ges.-N 1.53%		a) — b) — c) —
		Glutaminsäure-N 73.18% Prolin-N 0		
		(3.0 g) 0.233 g als N Gesamt-N 7.77%		
Rückstand				

TABELLE V.—(Fortsetzung).

Fraktionen	Säure- und Alkalikonzentration	0.10 n-Natronlauge		
Hydrolysat		8.504 g als N Amino-N/Ges.-N 37.04% Ammoniak-N/Ges.-N 16.33%		a) ++ b) + c) +
Essigätherauszug	Harzige Masse	0.133 g als N		a) ± b) - c) -
	A In Wasser schwer löslicher Teil	(0.213 g) 0.0251 g als N Gesamt-N 11.76%		a) - b) +++
	B In Wasser löslicher Teil	0.666 g als N Amino-N/Ges.-N 0.52% Ammoniak-N/Ges.-N 0.06%		a) - b) +++ c) ±
		Glutaminsäure-N 14.81% Prolin-N 19.99%		
Restlösung der Essigätherextraktion		7.166 g als N Amino-N/Ges.-N 43.06% Ammoniak-N/Ges.-N 20.07%		a) ++ b) ± c) +
C In Alkohol schwer löslicher Teil der Restlösung		(3.00 g) 0.1621 g als N Gesamt-N 5.405% Ammoniak-N/Ges.-N 24.93%		a) ± b) -
		Glutaminsäure-N 30.03% Prolin-N 2.62%		
D Von der Fraktion C abgetrennte alkoholische Lösung		6.929 g als N Amino-N/Ges.-N 38.90% Ammoniak-N/Ges.-N 16.50%		a) +++ b) ± c) +
D ₁ Durch Phosphorwolframsäure fällbarer Teil der Fraktion D		2.878 g als N Amino-N/Ges.-N 25.14% Ammoniak-N/Ges.-N 17.62%		a) + b) - c) +
		Glutaminsäure-N 32.55% Prolin-N 6.45%		
D ₂ Durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Teil der Fraktion D		2.067 g als N Amino-N/Ges.-N 83.92% Ammoniak-N/Ges.-N 2.60%		a) - b) - c) ±
		Glutaminsäure-N 68.57% Prolin-N 0		
Rückstand				

TABELLE V.—(Fortsetzung).

Fraktionen	Säure- und Alkalikonzentration	0.15 n-Natronlauge		
Hydrolysat		8.071 g als N Amino-N/Ges.-N Ammoniak-N/Ges.-N	42.83% 14.75%	a) + b) + c) +
Essigätherauszug	Harzige Masse	0.231 g als N		a) ± b) — c) —
	A In Wasser schwer löslicher Teil	(0.258 g) 0.0299 g als N Gesamt-N	11.59%	a) — b) + + +
	B In Wasser löslicher Teil	0.7268 g als N Amino-N/Ges.-N Ammoniak-N/Ges.-N	0.54% 0.54%	a) + b) + + + c) ±
		Prolin-N		20.23%
Restlösung der Essigätherextraktion		7.413 g als N Amino-N/Ges.-N Ammoniak-N/Ges.-N	43.12% 15.45%	a) + b) ± c) +
C In Alkohol schwer löslicher Teil der Restlösung		(2.20 g) 0.05622 g als N Gesamt-N Ammoniak-N/Ges.-N	2.556% 2.80%	a) — b) —
D Von der Fraktion C abgetrennte alkoholische Lösung		6.630 g als N Amino-N/Ges.-N Ammoniak-N/Ges.-N	43.44% 14.90%	a) + + b) ± c) ±
D ₁ Durch Phosphorwolframsäure fällbarer Teil der Fraktion D		2.904 g als N Amino-N/Ges.-N Ammoniak-N/Ges.-N	26.91% 16.50%	a) + b) — c) + +
		Glutaminsäure-N Prolin-N	34.43% 8.42%	
D ₂ Durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Teil der Fraktion D		2.238 g als N Amino-N/Ges.-N Ammoniak-N/Ges.-N	80.99% 1.16%	a) — b) — c) ±
		Glutaminsäure-N Prolin-N	73.58% 0	
Rückstand				

TABELLE V.—(Fortsetzung).

Fraktionen	Säure- und Alkalikonzentration	0.20 n-Natronlauge		
Hydrolysat		8.089 g als N Amino-N/Ges.-N Ammoniak-N/Ges.-N	46.27% 16.90%	a) ± b) ± c) +
Essigätherauszug	Harzige Masse	0.153 g als N		a) ± b) — c) +
	A In Wasser schwer löslicher Teil	(0.288 g) 0.0331 g als N Gesamt-N	11.48%	a) — b) + + +
	B In Wasser löslicher Teil	0.7657 g als N Amino-N/Ges.-N Ammoniak-N/Ges.-N	2.96% 0.23%	a) ± b) + + + c) +
		Glutaminsäure-N Prolin-N	13.01% 19.93%	
Restlösung der Essigätherextraktion		6.683 g als N Amino-N/Ges.-N Ammoniak-N/Ges.-N	55.13% 18.03%	a) + b) — c) +
C In Alkohol schwer löslicher Teil der Restlösung		(4.20 g) 0.09391 g als N Gesamt-N Ammoniak-N/Ges.-N	2.236% 9.20%	a) — b) —
		Glutaminsäure-N Prolin-N	76.32% 0	
D Von der Fraktion C abgetrennte alkoholische Lösung		6.445 g als N Amino-N/Ges.-N Ammoniak-N/Ges.-N	59.26% 15.91%	a) + + b) ± c) —
D ₁ Durch Phosphorwolframsäure fällbarer Teil der Fraktion D		2.326 g als N Amino-N/Ges.-N Ammoniak-N/Ges.-N	31.58% 10.94%	a) + b) — c) + +
		Glutaminsäure-N Prolin-N	37.27% 5.66%	
D ₂ Durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Teil der Fraktion D		2.238 g als N Amino-N/Ges.-N Ammoniak-N/Ges.-N	98.19% 1.05%	a) — b) — c) ±
		Glutaminsäure-N Prolin-N	59.05% 0	
Rückstand				

TABELLE VI.

Verteilung der Diketopiperazine, Peptiden und freien Aminosäuren
in den Abbauprodukten des Gliadins.

<div>Säure- und Alkali- konzentration</div> <div>Fraktionen</div>	0.10 n- H ₂ SO ₄	0.15 n- H ₂ SO ₄	0.20 n- H ₂ SO ₄	0.10 n- NaOH	0.15 n- NaOH	0.20 n- NaOH
Diketopiperazin-N (A + B)	0.7842 g (8.35%)	1.345 g (14.35%)	1.143 g (11.99%)	0.6911 g (7.36%)	0.7567 g (9.06%)	0.7988 g (8.51%)
Peptid-N + Diamino- säure-N (D ₁ - NH ₂)	1.913 g (20.36%)	0.9387 g (10.00%)	0.7625 g (8.00%)	2.371 g (25.24%)	2.425 g (25.84%)	2.071 g* (22.06%)
Monoamino- säure-N (D ₂)	2.192 g (23.34%)	2.485 g (26.49%)	2.423 g (25.42%)	2.067 g (22.02%)	2.238 g (23.84%)	2.233 g (23.83%)

mit denjenigen überein, welche von Uchino bei der Spaltung des Seidenfibroins erhalten wurden. Nur war die Ausbeute an Anhydriden im allgemeinen sehr gering.

Ferner zeigte es sich aus der Aminosäureverteilung in den Abbauprodukten (siehe Tabelle V), dass die Glutaminsäure nur in geringer Menge in der Anhydridfraktion auftritt, während sie sich in der Fraktion der freien Aminosäuren in grösserer Menge vorfindet. Aus diesem Umstand folgt, dass die Glutaminsäure enthaltende Peptide weniger geneigt sind, sich bei der Säure- und Alkalibehandlung in Anhydride zu verwandeln, als diejenigen aus Monocarbonsäuren. Dagegen kommt kein Prolin in der Fraktion der freien Aminosäuren vor, wohl aber in denjenigen von Diketopiperazinen und Peptiden. Dies besagt, dass die Prolinpeptide mehr Neigung haben in Anhydride überzugehen als die der Glutaminsäure.

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSS.

Das Gliadin wurde durch verdünnte Schwefelsäure und Natronlauge bei 170° unter Druck stufenweise abgebaut. Es

ergibt sich, dass im Falle des Gliadins die Hydrolyse mit Säure im Gegensatz zum Seidenfibroin viel schneller fortschreitet als die mit Alkali, und dass die Bildung der Anhydride unter den Abbauprodukten des Gliadins im allgemeinen in geringem Grade geschieht. Dieses abweichende Verhalten des Gliadins und des Seidenfibroins beruht wohl auf dem Unterschied der Zusammensetzung der Eiweisskörper.

Bei der Alkalibehandlung des Gliadins wird das Ammoniak, welches als Säureamid an Dicarbonsäure gebunden ist, in Freiheit gesetzt und entweicht teilweise aus der Hydrolysenflüssigkeit; dadurch wird eine beträchtliche Abnahme der Alkalinität der Lösung hervorgerufen. Daraus folgt, dass die Spaltung des Gliadins mit Alkali merklich langsam verläuft.

Die Peptiden, welche als Bestandteil Glutaminsäure enthalten, zeigten geringere Neigung sich in Anhydride zu verwandeln als die aus Monocarbonsäuren. Daraus geht hervor, dass bei der Spaltung des Gliadins, das annähernd zur Hälfte aus Glutaminsäure zusammengesetzt ist, nur eine geringe Menge von Anhydriden nachzuweisen ist.

Ich bin Herrn Assist. Prof. T. Uchino für seine freundliche Leitung bei dieser Arbeit zu herzlichem Dank verpflichtet. Auch Herrn M. Nakano spreche ich für die Ausführung der Elementaranalyse meinen verbindlichen Dank aus.

LITERATUR.

- Bergmann, M. (1935): Journ. of Biol. Chem., **110**, 471.
 Jones, D. B. and Moeller, O. (1928): Journ. of Biol. Chem., **79**, 429.
 Linderström-Lang, K. (1928): Ztschr. f. physiol. Chem., **173**, 32.
 Osborne, Th. B. und Straus, E. (1921): Abderhaldens Handb. der
 biol. Arbeitsmethoden, Abt. I. Teil 8. 437.
 Sasaki, T. (1921): Biochem. Ztschr., **114**, 63.
 Uchino, T. (1934): J. of Biochem., **20**, 65.

ÜBER DAS TRYPSINPEPTON (TRYPTON).

VON

FUYUTAROO ITZIOKA.

(Aus dem Utzino-Laboratorium des Institutes für Chemie an der Kaiserlichen
Universität Kyoto. Vorstand: Prof. S. Utzino.)

(Eingegangen am 30. Januar 1937)

Was die Endprodukte der Trypsinverdauung anbetrifft, so findet man in der Literatur darüber nur wenige und dazu auseinandergehende Anschauungen vor. Hier sind immer die Peptonkörper wie bei der Pepsinverdauung in Betracht gezogen, und im allgemeinen hat man das Endprodukt der Pankreasverdauung als Trypsinpepton (Pankreaspepton) bezeichnet.

Nach den ältesten Angaben, nämlich denen von W. Kühne und R. H. Chittenden (1883, 1886) über die Endprodukte der Trypsinverdauung (Pankreasextrakt) soll schliesslich als solches eine von diesen Forschern Antipecton genannte Substanz zurückbleiben, die durch Ammonsulfat nicht aussalzbar ist, die Biuretreaktion liefert, aber nicht die Millonsche Reaktion und der weiteren Trypsinverdauung sehr widersteht, während das Hemipecton weiter in Aminosäuren oder in andere Stoffe gespalten werden kann. Den obigen Forschern nach sollen die von ihnen als Amphopepton bezeichneten Pepsinpeptone in zwei Teile, nämlich in Hemi- und Antipecton, zerlegt werden. Nach den umfassenden Untersuchungen von M. Siegfried (1899, 1902, 1903) und F. Müller (1903) gab das Fibrintrypsinpepton (Pankreatinverdauung) eine positive Biuretreaktion, aber eine negative Millonsprobe und zeigte einen starken Widerstand gegen die weitere Trypsinwirkung. Daher mag es Antipecton im Sinne Kühnes sein. Da das Verhalten der Fleischsäure, die M. Siegfried als Spaltungsprodukte des Carniferrins erhielt, fast vollständig mit dem Antipecton von Kühne übereinstimmt, hat Siegfried beide als identisch oder als sehr wenig von einander verschiedene Körper hingestellt.

Fr. Kutscher (1898, 1898/99, 1899) erhielt nach lang anhaltender Fibrinverdauung durch Pankreasinfus ein heterogenes Gemenge von Verdauungsprodukten, von denen er Leucin, Tyrosin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Hexonbasen isolierte. Er kam so zu dem mit den Angaben Siegfrieds unverträglichen Schluss, dass als Endprodukte dieselben Körper auftreten, die wir auch bei der Eiweisshydrolyse durch starke Säure erscheinen sehen, während die Peptone nur Zwischenstufen bilden, und dass er die Annahme eines "Antipeptons" Kühne's für solche Durchgangsprodukte als durchaus unzulässig zurückweisen müsse. Nach den Beobachtungen von E. Fischer und E. Abderhalden (1903) soll die Caseinhydrolyse durch eine lang dauernde Pankreatinwirkung (Firma Rhenaria) stets nur partiell sein, und es sich bei dem schliesslich zurückbleibenden widerstandsfähigen Rest nicht mehr um Pepton handelt, wohl aber um ein kompliziertes Polypeptid, das nach mehrmaliger Fällung mit Phosphorwolframsäure die Biuretreaktion entweder gar nicht oder doch nur äusserst schwach lieferte und alle die Monoaminosäuren, die überhaupt bisher im Casein gefunden worden sind, enthielt.

Diese verschiedenen Angaben über die Endprodukte der Trypsinverdauung dürften in der Hauptsache ihre Ursache darin haben, dass die Forscher nicht einheitliche Pankreasenzyme verwendeten. Wie ich (1936) in den vorigen Mitteilungen angegeben habe, verhält sich die Proteolyse der Pankreasdrüse anders als diejenige des Sekretsaftes, der nur die Trypsinwirkung enthält und zwar kann die Pankreasdrüse selbst neben der eigenen Trypsinwirkung auch noch starke Peptidase- sowie Dipeptidasewirkung zeigen. In der vorliegenden Arbeit habe ich auf Veranlassung von Prof. S. Utzino das Endprodukt der Trypsinverdauung vom Standpunkt der enzymatischen Einstellung aus mit dem Pepton vergleichend studiert.

In der Hauptsache wurde also das Verhalten der Endprodukte, die nach wiederholter Trypsinwirkung mittels des Pankreassaftes von Kaninchen der weiteren Trypsinwirkung hartnäckig zu widerstehen vermögen, sowie des Peptons, das auch nach anhaltender Pepsinwirkung dargestellt wurde, den proteolytischen Fermenten

verschiedener Herkunft gegenüber studiert.

Das Trypsinpepton, das ich hier besonders als "Trypton"¹⁾ bezeichnen möchte, wurde in der Weise dargestellt, dass 1%ige Caseinlösung (pH 7.5) wiederholt so weit mit dem durch Kinase aktivierten Pankreassaft des Kaninchens bei 37° digeriert wurde, dass die Zunahme der Acidität sowie des Aminostickstoffes in der Digestionslösung durch weiteren Zusatz von Pankreassaft nicht mehr zu bemerken war. Diese Digestionslösung wurde weiteren Enzymversuchen unterworfen, da die Fällung oder weitere Reinigung der Endprodukte wegen Materialmangels nicht ausgeführt werden konnte.

Diese Tryptonlösung wurde nur auf einige Fällungsproben und Farbenreaktionen hin geprüft, um eine anschauliche Übersicht über die Eigenschaften des Tryptons zum Vergleichszweck mit dem Pepton anzugeben. Hier sei erwähnt, dass aus der Tryptonlösung (Endkonzentration ca. 0.85%) durch Phosphorwolframsäure und auch durch Phosphormolybdänsäure (20%) ein voluminöser und durch Sublimat (5%) sowie durch Tannin (20%) ein geringer Niederschlag, der sich in Tanninüberschuss teilweise wieder löst, ausgefällt wird.

Die Sättigung mit $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ruft keinen Niederschlag hervor. Auf Grund dieser Reaktionen scheint das Trypton in sehr naher Beziehung zum Pepton zu stehen.

Bemerkenswert ist es aber, dass das Pepton durch die weitere Trypsinwirkung noch gespalten werden kann, während das Trypton durch den Mazerationssaft der Magenschleimhaut nicht mehr angegriffen wird. Danach ist anzunehmen, dass die Trypsinwirkung eine noch weitere Einstellung als die Pepsinwirkung gegenüber Casein besitzt und dann das Spaltungsprodukt eine besondere Stellung unter der besonderen Bezeichnung "Trypton" in den Abbaustufen der Eiweisskörper einnehmen kann. Es ist noch weiter hervorzuheben, dass Pepton und Trypton durch Gewebsproteinase bei schwach alkalischer Reaktion deutlich hydrolysiert

¹⁾ In der Literatur hat schon W. Kühne (1883) seinerzeit das Anti-pepton als "sog. Trypton" bezeichnet.

werden können.

Bei den Versuchen mit Gewebsmazerationen wurde auch eine deutliche Aciditätszunahme, die am stärksten bei dem Versuche mit Nierenmazeration war, bei schwach saurer Reaktion beobachtet. Es entsteht nun die Frage, ob diese hydrolysierende Wirkung durch Gewebskathepsin oder durch Gewebspeptidase oder auch durch die beiden weiter hervorgerufen werden kann. Den Beobachtungen mit verschiedenen P_H -Werten nach hat man mit der schwach alkalischen Reaktion stets Aciditätszunahme und zwar die höchste bei P_H 7.0–7.5 festgestellt, nicht aber einen besonderen Aciditätsanstieg bei P_H 4.5–5.0. Andererseits hat man auch eine hydrolysierende Wirkung des Pankreasmazerationssaftes bei schwach alkalischer Reaktion beobachtet, was auch mit meiner früheren, bereits mitgeteilten Beobachtung gut übereinstimmt, dass nämlich die Pankreasmazeration neben der Trypsinwirkung noch Peptidasewirkung enthält, aber keine Kathepsinwirkung. Diese Ergebnisse legen die Annahme sehr nahe, dass die Pepton oder Trypton spaltende Wirkung der Gewebe optimal bei P_H 7.0–7.5 vor sich geht. Ob diese Wirkung auf die Gewebspeptidase oder ein besonderes Enzym—Peptonase—zurückzuführen ist, ist noch nicht entschieden, da es mir noch nicht gelungen ist, diese Peptonase von der Gewebspeptidase oder von der Gewebsdipeptidase zu trennen. Ich habe die Absicht, die chemischen Eigenschaften des Tryptons noch weiter zu untersuchen.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Versuch 1. Darstellung der Tryptonlösung.

300 ccm 1%iger Caseinlösung (P_H 7.5) wurden mit 6 ccm frischem Pankreassaft (Kaninchen), der mit 4 ccm 0.8%iger Kochsalzlösung auf 10 ccm verdünnt und mit 0.05 g Kinasepulver aktiviert wurde, vermischt und unter Toluolzusatz bei 37° der ersten Digestion unterworfen.

Sofort nach dem Vermischen wurden 10 ccm dieser Digestionslösung für die Bestimmungen abpipettiert, nämlich 4 ccm für die Formoltitration und 2 ccm für die NH_2 -N Bestimmung nach Van

Slyke.

Als Kontrolle wurden 300 ccm Pufferlösung (P_H 7.5) mit 10 ccm verdünnter Saftlösung ohne Substrat wie beim Hauptversuch digeriert. Nach 3 Tagen wurden 10 ccm Digestionslösung für die Bestimmung abpipettiert und die erste Digestion wurde alsdann unterbrochen.

Die Restlösung wurde weiter unter Zusatz von 10 ccm verdünnter Pankreassaftlösung der zweiten Digestion unter den oben angegebenen Bedingungen unterworfen. Wie die Tabelle I zeigt, war bei der dritten Digestion fast keine Zunahme der Acidität sowie des Aminostickstoffes zu bemerken. Diese Digestionslösung, welche klar von wenig ungelöstem abfiltriert wurde und ca. 0.85% Substrat enthielt, wurde auf folgende Reaktionen hin geprüft und dann mit ihr weitere Versuche angestellt.

TABELLE I.

Caseinspaltung durch wiederholte Trypsinwirkung.

Zeit	Hauptversuch		Kontrolle		Zunahme	
	ccm 0.1 n-NaOH in 4 ccm	mg NH_2-N in 2 ccm	ccm 0.1 n-NaOH in 4 ccm	mg NH_2-N in 4 ccm	ccm 0.1 n-NaOH in 4 ccm	mg NH_2-N in 2 ccm
Sofort	0.22	0.179	0.06	0.090		
3 Tage	1.33	1.416	0.07	0.139	1.10	1.188
Zweiter Trypsinzusatz						
Sofort	1.32	1.303	0.08	0.122		
5 Tage	1.43	1.476	0.12	0.161	0.07	0.134
Dritter Trypsinzusatz						
Sofort	1.42	1.401	0.10	0.149		
5 Tage	1.47	1.444	0.14	0.213	0.01	-0.021

Die Digestionslösung zeigte folgende Farbenreaktionen alles positiv: Biuret-, Xanthprotein-, Ninhydrin-, Bromreaktion und Adamkiewiczische sowie Millonsche Reaktion.

Das Trypton wird aus der Digestionslösung durch folgende

Reagentien nicht gefällt: Salpetersäure, Sulfosalicylsäure, Ferrocyanalkali-Essigsäure Trichloressigsäure (nach Folin), Pikrinsäure, Quecksilberjodidjodkalilösung, kolloidales Eisen, absoluten Alkohol (5 faches Volumen) und Methanol (5 faches Volumen). Kochprobe fällt auch negativ aus. Es wird durch Phosphorwolfram- sowie durch Phosphormolybdänsäure (20%) als ein voluminöser Niederschlag gefällt, aber durch Tannin (20%) und durch Sublimat (5%) teilweise gefällt. Bei der Sättigung mit Ammonsulfat in Substanz wird nur schwache Trübung der Lösung, aber keine Fällung beobachtet.

Versuch 2. Verhalten der Trypton- und der Peptonlösung gegenüber der Enzymwirkung verschiedener Herkunft.

20 ccm Caseino-Tryptonlösung, die in der Weise, wie in Versuch 1 angegeben, hergestellt worden war und als Endkonzentration des Substrats ca. 0.85% enthielt, wurden mit 4 ccm Enzymlösung unter Toluolzusatz bei 37° digeriert.

Als Enzymlösung wurde 1 Teil Gewebsbrei mit 6 Teilen Glycerinwasser (6:4) gut zerrieben und koliert oder 1 ccm frischer Pankreassaft mit 19 ccm Wasser versetzt und durch 0.025 g Kinasepulver in der bereits früher angegebenen Weise aktiviert.

Die angegebenen PH-Werte sind mittels Soda, Essigsäure oder Salzsäure, welche letztere nur für die Pepsinprobe (PH 2.0) Verwendung fand, eingestellt, wenn es nötig war.

Als Kontrolle wurden Enzym-Pufferlösungen ohne Substrat unter den gleichen Bedingungen wie die beim Hauptversuche digeriert. In der Tabelle sind die kontrollierten Zahlen angegeben.

Das hier angewendete Pepton wurde auch durch die wiederholte Einwirkung von Mazerationssaft der Magenschleimhaut (Schwein) auf Caseinlösung in der gleichen Weise wie Trypton hergestellt. Nachdem die Zunahme der Acidität und des Aminostickstoffes der Pepsinverdauung nicht mehr zu bemerken war, wurde aus der einmal filtrierten Digestionslösung das Pepton durch Methanolzusatz ausgefällt. Bei nochmaliger Umfällung mit Methanol aus der konzentrierten wässrigen Lösung erhielt man das Pepton fast farblos in Form von Pulver, nachdem man es mit

Aceton, dann mit Äther gewaschen und im Exsikkator getrocknet hatte. Für die Versuche wurde 1%ige Peptonlösung verwendet. Aus der Tabelle ersieht man, dass die Peptonlösung durch Pankreassaft (aktiviert) noch angegriffen wird, während die Tryptonlösung durch die Magenschleimhaut nicht hydrolysierbar ist.

Niere, Leber, Dünndarmschleimhaut und auch Pankreasdrüse vermögen diese beiden Körper anzugreifen.

TABELLE II.

Trypton- und Peptonspaltung.

Substrat	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0.1n-NaOH)											
	PH Zeit (Std.)	Pankre- assaft		Mazerationssaft								
				Pankreas		Ma- gen	Dünndarm		Leber		Niere	
		4.5	7.5	4.5	7.5	2.0	4.5	7.5	4.5	7.5	4.5	7.5
Trypton	5	—	0.03	0	0.13	0.05	0.09	0.48	0.13	0.43	0.27	0.77
	24	—	0.01	0.04	0.26	0.05	0.22	0.57	0.24	0.86	0.57	0.96
	72	—	0.06	0.12	0.42	0.06	0.35	0.59	0.35	1.97	0.71	0.94
Pepton	5	0	0.24	0.13	0.27	0	0.14	0.35	0.14	0.22	0.24	0.42
	24	0.02	0.35	0.26	0.49	0	0.23	0.70	0.33	0.53	0.52	0.72
	72	0.05	0.39	0.31	0.60	0	0.36	0.95	0.36	0.71	0.81	1.01

Versuch 3. Peptonspaltung durch Nieren- oder Leberenzym bei verschiedenen PH-Werten.

Für die Peptonspaltung durch Gewebsenzymlösung wurden hier die Versuche bei verschiedenen PH-Werten angestellt. 2 ccm 1%ige Peptonlösung enthielten 4 ccm Enzymlösung.

Die Tabelle, in der die kontrollierten Zahlen angegeben sind, zeigt, dass sich die höchste Aciditätszunahme bei PH 7.0–7.5 fand.

TABELLE III.

Peptonspaltung bei verschiedenen PH-Werten.

Mazera- tionssaft	Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0.1 n-NaOH)						
		PH						
		4.0	4.5	5.0	6.0	7.0	7.5	8.0
Niere	24	0.17	0.26	0.31	0.59	0.60	0.63	0.60
	72	0.31	0.50	0.64	0.95	0.99	0.99	0.95
Leber	24	0.17	0.19	0.23	0.53	0.60	0.60	0.53

ZUSAMMENFASSUNG.

1) In der vorliegenden Arbeit habe ich das Verhalten der durch den Pankreassaft des Kaninchens sowie die Magenschleimhaut des Schweins erzeugten Spaltungsprodukte des Caseins (Hammersten) der Enzymwirkung verschiedener Herkunft studiert.

Das hier untersuchte sogenannte Trypsinpepton, das ich als "Trypton" bezeichnen möchte, verhält sich verschiedenen Fällungsreagentien gegenüber fast gleich wie das Pepton (Spaltungsprodukt des Caseins durch Magenschleimhaut bei PH 2.0).

2) Das Pepton wurde weiter durch den aktivierten Pankreassaft angegriffen, während die Tryptonlösung der weiteren Wirkung der Magenschleimhaut sowie des Pankreassaftes hartnäckig widerstand.

3) Der Pankreasmazerationssaft des Kaninchens griff trotzdem die Trypton wie auch die Peptonlösung an. Bei dieser Wirkung dürfte es sich um die Gewebspeptidase handeln.

4) Trypton- und auch Peptonlösung wurde ferner durch Niere, Leber und Dünndarmschleimhaut bei schwach alkalischer Reaktion angegriffen. Diese hydrolysierende Wirkung der Niere wurde auch deutlich bei schwach saurer Reaktion (PH 4.5) beobachtet.

5) Bei den Versuchen mit verschiedenen PH-Werten fand sich der Optimalbereich für Gewebspeptonase für Niere und Leber bei PH 6.0–8.0.

LITERATUR.

- Fischer, E. und Abderhalden, E. (1903): Z. f. Physiol. Chem., **39**, 81.
Itzioka, F. (1936): J. of Biochem., **24**, 139 u. 267.
Kühne, W. und Chittenden, R. H. (1883): Z. f. Biol., **19**, 159.
Kühne, W. und Chittenden, R. H. (1886): ebenda, **22**, 435.
Kutscher, Fr. (1898): Z. f. physiol. Chem., **25**, 195.
Kutscher, Fr. (1898-99): ebenda, **26**, 110.
Kutscher, Fr. (1899): ebenda, **28**, 88.
Müller, F. (1903): Z. f. physiol. Chem., **38**, 256.
Siegfried, M. (1900): Ber. d. chem. Ges., **33**, 2851.
Siegfried, M. (1899): Z. f. physiol. Chem., **27**, 335.
Siegfried, M. (1902): ebenda, **35**, 164.
Siegfried, M. (1903): ebenda, **38**, 256.

ÜBER α -GUANIDOGLUTARSÄURE.

Betrachtungen über die möglichen Vorstufen des Kreatins.

VON

KARL THOMAS UND AKIRA AKAO.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 30. Januar 1937)

Aus welchem seiner Bausteine und auf welche Weise der Tierkörper sich das Kreatin herstellt, ist trotz der vielfachen Bemühungen namhafter Forscher in allen Kulturländern immer noch unbekannt. Verantwortlich dafür ist vor allem der Umstand, dass die Gewebe einen recht gleichmässigen Kreatingehalt haben, der unter dem Zwange auch recht einseitiger Versuchsbedingungen, sogar bei Zufuhr von Kreatin, nur wenig schwankt. (S. neueste Beobachtungen in dieser Beziehung: Bodansky (1936). Kreatin ist ja kein Schlackenstoff, der als weiterhin unbrauchbar vom Körper ausgeschieden werden muss. Er lässt sich nicht mit Harnstoff auf eine Stufe stellen, eher mit dem Zucker vergleichen. Wie dieser ist Kreatin ein wichtiges und notwendiges Maschinenteilchen des Protoplasmas, das im Betriebsumsatz gebraucht, aber nur in geringem Masse dabei auch verbraucht wird. Und ebenso, wie man die Einrichtungen, die den Zuckerumsatz regulieren, nur schwierig am Stoffwechselgesunden studieren kann, aber am Zuckerkranken mit Erfolg studiert hat, hat man auch am Kreatinuriker die Frage nach der Herkunft des Kreatins untersucht. Wäre man dabei nicht auf Patienten angewiesen, bei denen man die Schwere ihrer Erkrankung nicht kennt und nicht beeinflussen kann, sondern könnte man ebenso wie beim Studium des Zuckerstoffwechsels durch experimentelle Eingriffe die Schwere der Störung im Kreatinhaushalt genau dosieren und spezifisch begrenzen, dann wären wir schon längst weiter. Es gibt zwar einige physiologische Kreatinuriceen, vor allem im jugendlichen Alter (neueste Übersicht bei Marples u.

Levine, 1936). Aber zu Stoffwechselversuchen sind solche Menschen und Tiere recht wenig geeignet. Auch manche andere krankhafte Zustände, führen zu Kreatinurie, vor allem Zuckermangel in den Geweben (Bürger, Brentano) und Basedow (Shorr, Richardson u. Wolff, 1933/34/35). Trotzdem diese Mängel experimentell zu erzeugen sind, eignen sie sich jedoch ebenfalls zu den Versuchen wenig, da sie offenbar nicht direkt etwas mit dem Kreatinhaushalt zu tun haben. Eine physiologische Kreatinurie besteht ausserdem beim Vogel; allerdings scheint sie keine vollständige zu sein. Denn auch Kreatinin scheiden diese Tiere aus und das Verhältnis, in dem Kreatin und Kreatinin zueinander stehen, scheint nach der Literatur (A. Hunter) recht stark zu schwanken. Wir haben daher hier mit Unterstützung von Frl. Pauls in bisher noch nicht veröffentlichten Versuchen geprüft, ob das Huhn als physiologisches Haustier zu Studien über den Kreatinhaushalt zu gebrauchen ist. Terroine (1936), Beard (1931/35/36), meinen, dass der Kreatingehalt der Gewebe und unter passenden Bedingungen die im Harn ausgeschiedene Kreatinmenge abhängt von der Höhe des Eiweissumsatzes, wobei es gleichgültig ist, ob es sich um mit der Nahrung zugeführtes Eiweiss oder aus dem eigenen Gewebe entnommenes handelt. Andere Autoren, insbesondere in neuerer Zeit Chanutin (1930), Rose (1935), Bodansky (1936) bestreiten dies. Um wenigstens diese Frage bei einer physiologischen Kreatinurie einer weiteren Klärung zuzuführen, fütterten wir erwachsene Hühner und Hähne eiweissarm und eiweissreich und bestimmten den Kreatingehalt der Ausscheidungen. Es ergab sich, dass immer nur sehr wenig Kreatinin—einige % vom Gesamtkreatinin—ausgeschieden wurde, aber auch die Kreatin-Ausscheidung stark schwankte. Unsere Tiere waren nicht operiert, wir hatten also Harn + Kot zu analysieren im Gegensatz zu Thompson (1905/06/17), der eine Darmfistel angelegt hat. Wir reinigten daher unseren Auszug mit Bleiacetat und H_2S . In dem Gedanken, dass die Geschlechtsorgane von Einfluss auf die Kreatinausscheidung sind und wir keine gleichmässige Ausscheidung über eine Reihe von Tagen bei gleichmässiger Fütterung erzielen konnten, benutzten wir später nur kastrierte Hähne

(Kapaune) und zwangen die Tiere nicht mehr durch ihren Käfig während der ganzen Zeit des Versuchs eine bestimmte Stellung einzuhalten. In der Tat schieden die Tiere jetzt sehr viel gleichmässiger Kreatin aus. Drei Gruppen liessen sich dabei unterscheiden. In der ersten wurden bei eiweissarmer Fütterung nur wenige Milligramm Gesamtkreatin in der Tagesmenge pro Kg ausgeschieden. In der dritten etwa 20 mg/Kg. Reicherten wir den Eiweissgehalt des Futters durch Casein und Leber sehr stark an, so stieg bei den Tieren der ersten Gruppe die Ausscheidung stark an — bis auf 20 mg und mehr —, bei denen der dritten Gruppe jedoch nur noch wenig. Die zweite mittlere Gruppe (eiweissunterernährt) schied mittlere Mengen aus und zeigte bei Eiweisszulage zwar einen deutlichen, aber doch nur geringen Anstieg. Wir wissen nicht, worauf diese Unterschiede in dem Verhalten der Tiere beruhen. Es erscheint uns keineswegs sicher, dass es sich um Unterschiede im allgemeinen Stoffwechsel z. B. der quergestreiften Muskulatur handelt. Es könnten auch bloss die Nieren der Tiere verschieden gut ihren Kreatin-Schwellenwert einhalten, d. h. bei den übergrossen Mengen Harnsäure, die eiweissreiche Fütterung zur Folge hat, das Kreatin bei ihnen weniger vollständig rückresorbiert werden als sonst. Wir schliessen also, dass auch Kapaune vorher eingehend auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen sind, bevor man sie zu Versuchen über den Kreatinhaushalt benutzt.

Man kann immer den Einwand machen, dass das, was man nach Folin bestimmt, nicht nur Kreatinin und Kreatin ist, da die Pikrinsäure-Reaktion ja nicht spezifisch ist. Die bessere Methode von S. R. Benedict u. Behre (1936) mit Dinitrobenzoesäure ergab auch an unserem gereinigten Auszug unbrauchbare braune Färbung. Wir überzeugten uns daher durch die möglichst quantitative Darstellung eines charakteristischen Kreatinabkömmlings aus dem Harn bei eiweissarmer Fütterung, dass die nach Folin bestimmten Mengen wirklich annähernd vorhanden sind. Wir wandelten mit Mineralsäure in Kreatinin um, adsorbierten dies an Frankonit KL und eluierten mit Baryt. Die Lösung enthielt 84% des nach Folin bestimmten Farbkörpers; aus ihr liess sich Kreatinin-Kalium-Pikrat niederschlagen. Nach einma-

ligem Umkristallisieren erhielten wir es in einer Ausbeute von 92% des Folin-Wertes vom Eluat. Kreatin aus Vogel-Exkrementen hat schon 1868 Meissner isoliert.

Wenn der Tierkörper Kreatin bildet, hat er dreierlei Reaktionen durchzuführen:

- 1) er muss das Essigsäure-Gerüst bilden,
- 2) die Guanidingruppe aufbauen,
- 3) sie an bestimmter Stelle methylieren.

Beim Kreatin kann man über die Methylierung heute wohl nur so viel sagen, dass sie die Synthese wahrscheinlich abschliesst. Denn der einzige Stoff, der verfüttert regelmässig und mit verhältnismässig hoher Ausbeute Kreatin gibt, ist bis heute allein Guanidoessigsäure. S. dazu die kritische Übersicht in Hunter's Monographie und in Mitchell u. Hamilton (1929) S. 334. Den neuesten Beitrag zu dieser Frage hat Bodansky's (1936) geliefert. Da er auch ihre geschichtliche Entwicklung schildert, verzichten wir hier auf sie einzugehen. Eine Zunahme des Kreatingehalts der Gewebe und eine Mehrausscheidung im Harn waren und sind die Kriterien für die Methylierung der zugeführten Guanidoessigsäure. In noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen wurde einem schwerkranken Muskeldystrophiker Guanidoessigsäure in Mengen gefüttert, die seine Toleranz für diesen Stoff überstiegen. Etwa die Hälfte ging dabei in Kreatin über, das Dr. Klinger nicht nur kolorimetrisch bestimmt, sondern auch als Kreatinin isoliert hat. Es schien uns nötig, diese präparative Kontrolle durchzuführen, da Guanidoessigsäure bei der Folin-Bestimmung auch reagiert und also seine Gegenwart zu hohe Werte für dieses vortäuscht. Darauf ist schon von verschiedenen Autoren aufmerksam gemacht worden. Bodansky (1936, s. 618) findet 100 mg kolorimetrisch gleichwertig mit 4 mg Kreatinin, wir mit 9–10 mg. Er autoklaviert mit Pikrinsäure. Bei der Umwandlung des Kreatins arbeiten wir nach A. Hahn ($n/1$ HCl, 24 Std. 65°) und fanden etwa 15% der Guanidoessigsäure in Glykoeyamidin verwandelt; dieses reagiert mit Pikrinsäure nach Benedict und Behre S. 518 zu etwa 60%, welchen Wert auch wir fanden.

Wenn die Methylierung an den Schluss verlegt ist, dann würde

Sarkosin keine Vorstufe sein und nicht in Kreatin übergehen. Dies stimmt mit Beobachtungen Bodansky's (1936) überein, um wiederum nur die letzte Experimental-Arbeit anzuführen; ebenso mit unseren eigenen Untersuchungen. Ausserdem fand Thomas schon vor mehreren Jahren bei einem für Glykokoll sehr empfindlichen Dystrophiker Sarkosin therapeutisch gänzlich unwirksam (nicht veröffentlicht). Es scheint also so, als ob die Methylierung nicht an den Anfang zu verlegen ist. Beim Arginin haben Thomas, Kapfhammer u. Flaschenträger (1922) dies seinerzeit als Arbeitshypothese getan. Sie wollten auf diese Weise das Kreatin aus einem im Muskeleiweiss noch gebundenen δ -Methylarginin herausspalten.

Die Guanidingruppe des Arginins wird in der Leber nach Krebs (1932) in zwei Stufen über die Ureidogruppe gebildet. Auf die gleiche Weise entsteht die Guanidoessigsäure aus Glykokoll offenbar nicht; denn Hydantoinsäure vermehrt nicht wie die beiden genannten unter passenden Bedingungen die Kreatin-Ausscheidung (Thomas, Milhorat u. Techner (1933) S. 136). Es wäre demnach an die Reaktion von Bergmann u. Zervas (1927) zu denken, bei der Cyanamid, das im Triacetylargininanhidrid gelockert vorliegt, auf Glykokoll und Sarkosin übertragen wird. Der Unterschied gegenüber dem Geschehen im Tierkörper besteht darin, dass dieser Sarkosin offenbar und andere Aminosäuren des Eiweisses anscheinend nicht in die Guanidoverbindungen überführen kann.

Bodansky (1936) verlegt den Ort dieser Guanidinbildung in die Niere. Dafür spricht auch, dass Spuren von Guanidoessigsäure im Harn des stoffwechselgesunden Menschen vorkommen (Weber (1934/1936), Ackermann (1936), Sullivan (1935/36), obgleich seine Toleranz für diesen Stoff sehr viel grösser ist (Dr. Klinger). Andererseits scheidet der Muskeldystrophiker auch ohne Glykokollzufuhr grössere Mengen davon aus. Es scheint also, also ob doch auch die Muskeln an der Bildung von Guanidoessigsäure irgendwie beteiligt sind.

Das Essigsäure- bzw. Glykokoll-Gerüst des Kreatins kann auf zwei Wegen gebildet werden, durch Abbau einer Aminosäure oder

durch Aminierung eines N-freien Bruchstücks, also durch Synthese.

A. Dieser letztere Weg wird sicher beschritten, wenn der Körper, mit Benzoesäure überschwemmt, mehr Glykokoll als Hippursäure ausscheidet, als er überhaupt hat (Abderhalden). Hier ist sein N auf Kosten von Harnstoff entstanden (Sherwin). Das C-Gerüst stammt offenbar in letzter Linie aus dem Zucker der Nahrung. Dabei entsteht das Glykokoll in der Niere und in der Leber und deshalb kann unserer Meinung nach der Muskeldystrophiker diese Hippursäure-Synthese genau so gut vollziehen wie der Gesunde (Freiberg u. West (1933) und andere). Entsteht auf die gleiche Weise auch im Muskel Glykokoll? Direkt lässt sich dies experimentell nicht beweisen. Die bisherigen Beobachtungen sprechen nicht dagegen, wie im folgenden gezeigt werden soll:

1) Die Mehrausscheidung von Kreatin beim Muskeldystrophiker, der Glykokoll bekommt, verschwindet nach einigen Wochen wieder oder vermindert sich wenigstens, auch bei steigender Glykokollzufuhr. In dieser Zeit bessert sich manchmal das Befinden des Kranken; wahrscheinlich doch wohl auch der Zustand seiner Muskeln, was ja einwandfrei direkt nicht untersucht werden kann. Daher deuteten Milhorat (1933) und Thomas (1934) die Mehrausscheidung von Kreatin als eine Mehrbildung, ohne zu behaupten, dass dabei Glykokoll direkt in Kreatin übergeführt wird. Wir denken uns, dass der kranke Muskel die Fähigkeit Kreatin zu bilden zum Teil verloren hat, eine Fähigkeit, die er offenbar von Hause aus hat. Sie kommt unter der Glykokolltherapie anfangs wieder besser zum Vorschein, weil das gebildete Kreatin noch nicht so vollständig wie später bei noch weiterer Reparatur der dystrophischen Muskeln zurückgehalten werden kann. Dies ist im Grunde genommen natürlich nur eine spezialisiertere Vorstellung von der "Stimulierung des Zellstoffwechsels", die auch Bodansky (1936) für möglich hält. Er denkt auch daran, dass Glykokoll das Muskelkreatin nur stärker auswäscht. Warum fällt dann aber bei gleichbleibender oder sogar noch gesteigerter Zufuhr die Mehrausscheidung von Kreatin so langsam wieder ab? Diese mehrfach bestätigte Beobachtung von Milhorat—zuletzt durch

Braestrup (1936)—verträgt sich unserer Meinung nach nicht mit der Annahme eines Auswaschens oder einer Mehrbildung in der Niere.

2) Auch mit dem, was wir neuerdings über das Verhalten der Guanidoessigsäure im Stoffwechsel wissen, lässt sich die Annahme einer Synthese im Muskel vereinen. Verfütterte Guanidoessigsäure geht in beträchtlichem Umfang in Kreatin über. Diese Methylierung kann in der Niere, aber ebenso gut in der Muskulatur vor sich gehen. Denn der Dystrophiker, dessen Kreatin-Toleranz schon stark beansprucht ist, muss daher ein Mehr davon sogleich wieder ausscheiden. Warum entsteht aber bei Fütterung von Glykokoll, das doch in Guanidoessigsäure übergeht, sehr viel weniger Kreatin und geht mit der Zeit die Mehrausscheidung wieder zurück? Wir nehmen in Übereinstimmung mit Bodansky an, dass diese Guanidoessigsäure zur Hauptsache erst in der Niere entsteht, also nicht im Muskel methyliert werden kann. Auch verfütterte Guanidoessigsäure wird ja sehr rasch wieder durch die Niere entfernt, was dazu passt. Andere Organe enthalten wenig Kreatin und verfügen anscheinend also auch nur über eine geringe Fähigkeit die Guanidoessigsäure zu methylieren; sie brauchen daher hier nicht weiter in Betracht gezogen zu werden.

3) Bodansky fand bei Ratten, die mit Glykokoll gefüttert waren, keine regelmässige und die analytische Fehlergrenze übersteigende Zunahme des Kreatin-Gehalts der Muskeln und dort auch keine Guanidoessigsäure. Demnach wäre Glykokoll dort keine Vorstufe zu Kreatin? Aber der Dystrophiker scheidet bei Zufuhr von Glykokoll, sehr viel grössere Mengen Guanidoessigsäure aus als ohne es (Weber(1936), eigene Beobachtungen). Man muss daraus schliessen, dass er entweder Glykokoll nicht mehr so gut wie der Muskelgesunde auf irgendwelche andere Weisen in den Muskeln abbauen kann und daher bei ihm mehr Glykokoll noch die Nieren erreicht und dort Guanidoessigsäure wird, oder man muss schliessen, dass bei ihm die Toleranz für Guanidoessigsäure ebenso erniedrigt ist wie für Kreatin, und dass daher die im Muskel aus Glykokoll entstandene Guanidoessigsäure bei ihm mehr als beim Gesunden die Niere erreicht und ausgeschieden wird. Wir haben

aus hiesigen Toleranz-Bestimmungen Anlass zu glauben, dass die letztere Annahme zutrifft.

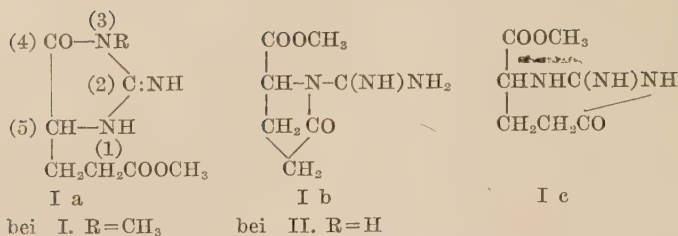
B. Bei dieser Unsicherheit wird man immer wieder auch die andere Weise im Auge behalten, auf welche Glykokoll oder Guanidoessigsäure im Muskel entstehen könnte: nämlich durch Abbau von Amino- oder Guanidosäure. Bestärkt wird man hierbei durch die überaus überraschenden Befunde aus Beard's Laboratorium, die allerdings in Widerspruch zu früheren Befunden anderer Autoren stehen und auch neuerdings z. B. von Bodansky längst nicht in vollem Umfang bestätigt werden konnten. Aus der Reihe der α -Aminosäuren führt nur Glykokoll regelmässig zu einer geringen Steigerung der Kreatin-Ausscheidung beim Dystrophiker. Andere, von denen man dies ebenso annehmen könnte, wie z. B. Glutaminsäure, tun dies nicht. Begreiflicherweise, denn der Hauptweg ihres Abbaus führt wohl über Bernsteinsäure. Wir (l. c. (1933) S. 126) haben aber schon darauf hingewiesen, dass die peptidgebundene Glutaminsäure dennoch vom anderen Ende her abgebaut werden könnte. Man kann sich die Arbeitshypothese machen, dass sie dabei zuerst in die am Carboxylende noch peptidgebundene α -Guanidoglutarsäure übergeht. Es wäre also zu prüfen, ob der Tierkörper diese bei ihrer Zufuhr d. h. auch wenn sie nicht peptidgebunden an bestimmter Stelle vorliegt, in Guanidoessigsäure und allenfalls Kreatin überführen kann. Wir können heute noch nicht über einen biologischen Versuch mit der Säure berichten. Beiträge zu Festschriften müssen an einen bestimmten Ablieferungstermin gebunden sein. Um jedoch unter den Gratulanten nicht zu fehlen, berichten wir über unsere bisherigen Teilergebnisse, über die Darstellung der Säure im grossen und Versuche sie oder Abkömmlinge von ihr im Harn, der auch Guanidoessigsäure und Kreatin enthalten kann, wieder aufzufinden.

1) *Darstellung und Eigenschaften von α -Guanidoglutarsäure.*

Sie ist ein ohne besondere Mühe zugänglicher Stoff geworden. Glutaminsäure wird aus ihrem billigen Chlorhydrat mittels Anilin (1920) bereitet. Bei ihrer Umsetzung mit Isoharnstoff-methyl-

äther haben wir uns eng an die Vorschrift von Kapfhammer und Müller (1934) S. 10 gehalten. Es empfiehlt sich aber das Isoharnstoffsalz der Guanidoglutarsäure so lange mit 3% Wasser enthaltendem Methanol auszuwaschen, bis es analysenrein ist. Dann erhält man aus ihm die Säure mit guter Ausbeute und sauber. Dies ist wichtig, da sie selbst spielend in Wasser und in keinem anderen Mittel löslich ist, sich nicht umkristallisieren lässt und beim Umfällen Wasser hartnäckig zurückhält. Sie wird aus ihrer Lösung nicht durch Pikrinsäure, Pikrolonsäure, Phosphorwolframsäure und Goldchlorid-chlorwasserstoffsäure gefällt und gibt auch kein schwer lösliches Metallsalz. Frankonit KL adsorbiert sie im Gegensatz zu Guanidoessigsäure nicht, dagegen nimmt nach Brockmann standardisiertes Aluminiumoxyd je gr aus ihrer reinen Lösung etwa 5 mg auf. Wir denken, dass auf diese Weise auch aus Körperflüssigkeiten wie Harn die beiden Stoffe sich trennen lassen, wenngleich uns ihre Elution aus dem Adsorbat aus Harn nur zu etwa 50–75% gelungen ist (Kolorimetrische Bestimmung mit Hilfe der hier schlecht ausführbaren Sakaguchi-Reaktion).

Wir versuchten daher Derivate herzustellen, die entweder schwer löslich sind oder für Adsorption und Fällungen bessere Eigenschaften besitzen. Es kamen naturgemäss in erster Linie ihre Ester in Betracht, insbesondere der Di-ester, der basisch ist und ähnlich anderen Guanidosäure-estern als Salz beständig sein könnte. Mit Salzsäure und Methanol bekamen wir kein kristallisiertes Estersalz, dagegen als wir die in Methanol aufgeschlämmte Guanidosäure mit Diazomethan behandelten. Das Reaktionprodukt war wie erwartet basisch und gab mit Pikrinsäure und HAuCl_4 kristalline Fällungen, die sich aber rasch zersetzten und daher nicht zu isolieren waren. Als Oxalat (F_p 146°) erhielten wir einen Stoff $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}_3\cdot\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$, der stimmende Analysenwerte für den Monomethylester eines Anhydrids, das ausserdem 1 NCH_3 besitzt, gibt. Welche von den möglich erscheinenden beiden Formulierungen Ia und Ib der Base zukommt, haben wir nicht geprüft. Ic steht im Widerspruch mit der Tatsache, dass sich aus γ -Guanidobuttersäure kein Anhydrid bereiten lässt (Gansser, 1909).



Bei schwächerer Einwirkung von Diazomethan entsteht ein anderes NCH₃-freies Oxalat (C₇H₁₁O₃N₃)₂.C₂H₂O₄; F_p 208–210°, dem wir ebenfalls wieder mit allem Vorbehalt und nur auf Grund der Analysenergebnisse die möglichen Formulierungen II a als Hydantoin oder II b als Pyrrolidon zuschreiben.

Der Monophenacylester (F_p 246°), der aus der Guanidosäure dargestellt wurde, stimmt in den Analysenergebnissen mit dem eines Anhydrids überein; er besitzt aber andere Eigenschaften als der Phenacylester, der aus dem Anhydrid der Guanidosäure (s.u.) bereitet wurde. Auch dies lässt sich verstehen, da die Säure theoretisch zwei verschiedene cyclische Anhydride bilden kann.

2) Anhydrid der α-Guanidoglutarsäure.

Hält man die Guanidosäure längere Zeit im Hochvakuum über P₂O₅ bei 110°, so verliert sie langsam und nicht mehr an Gewicht, als der Abgabe von 1 H₂O entspricht. Die neue in Prismen gut kristallisierende Säure gibt keine Pikrinsäure- und auch keine Sakaguchi Reaktion, die letztere aber, wenn Natronlauge auf sie schon ganz kurz eingewirkt hat, wozu u.U. schon die zur Anstellung der Reaktion verwendete Lauge genügt. Mit HCl-Methanol lässt sich in theoretischer Ausbeute das Methylester-Chlorhydrat C₇H₁₁O₃N₃.HCl (F_p 135°) bereiten. Die Konstitution des Anhydrids haben wir durch Abbau-Versuche noch nicht aufgeklärt, wir nehmen auf Grund der leichten Rückverwandlung in ein die Sakaguchi Reaktion gebendes Guanidin an, dass im Anhydrid der Pyrrolidonring vorliegt. Denn auch diese Ringschliessung und -öffnung geht bei der Glutaminsäure sehr leicht vor sich, sehr viel leichter als die Öffnung eines Hydantoinringes.

Zum Schluss und gewissermassen nur im Anhang beschreiben wir als neu den Di-Phenacyl-ester der α -Ureidoglutarsäure von Lippich und den Phenacyl-ester ihres Anhydrids sowie den der Hydauntinsäure. Wir haben diese Ester dargestellt, weil die Säuren im Stoffwechsel aus der Guanidoglutarsäure auftreten und die Ester dann zu ihrer Charakterisierung dienen können. Für sehr wahrscheinlich halten wir dies allerdings nicht. Denn Kreatinin gibt nur bei der Fäulnis Methylhydantoin Ackermann (1913) und die ε -Guanidocaprinsäure nur in geringem Ausmass die entsprechende Ureidosäure (1914). Bei Verfütterung der ω -Methylguanidosäuren war die Suche nach den entsprechenden Ureidosäuren vergeblich (1933).

VERSUCHSTEIL.

 α -Guanidoglutarsäure.

Darstellung: Cyanamid aus Kalkstickstoff nach Baum (1908). Daraus Isoharnstoffmethyläther-chlorhydrat nach Stieglitz u. McKee (1900) in Ansätzen bis zu über 2 Mol; z. B. gaben 90 gr Cyanamid in 1500 ccm absol. Methanol 220 gr Chlorhydrat = 84% d. Th. Glutaminsäure aus ihrem Chlorhydrat nach Hugouneau u. Florence (1920). Kondensation nach Kapfhammer u. Müller (1934), aber in grösseren Ansätzen bis zu 3/5 Mol Glutaminsäure. z. B. 88,5 gr von ihr, 9/5 Mol Isoharnstoffsalz (200 gr) in 800 ccm (statt 2400 ccm nach Vorschrift). Reinigung des Isoharnstoffsalzes der Guanidoglutarsäure: 125 gr Rohprodukt wurden mit 30 ccm Wasser angefeuchtet und in 4 Portionen je 250 ccm Methanol zugesetzt und geschüttelt. Dann wurde abgesaugt und i. V. über H_2SO_4 getrocknet.

	C	H	N	
Rohprodukt	36,47	6,39	25,17	125 gr
1. Reinigung	36,63	6,72	25,65	114 gr = 90%
2. „	36,60	6,48	26,46	109 gr = 85%
Für $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}_5\text{N}_5$ (263,2) ber.	36,48	6,51	26,61	

Daraus Bereitung der Guanidoglutarsäure nach Vorschrift. Ausbeute 77,0 gr = 98,7% d. Th., analysenrein und frei von OCH_3 .

Zersetzungspunkt 150–152° (K. u. M. 155–160°).

	C	H	N
Für $C_6H_{11}O_4N_3$ (189,1) ber.	38,16	5,86	22,21
gef.	37,84	5,93	22,03
	37,91	6,04	22,14

Adsorbierbarkeit: 10 cem Lösung, enthaltend 0,5 mg Guanidoglutarsäure (Sakaguchi R. schwach pos.) wurden mit 1,0 gr Frankonit S, Frankonit KL, Bolus Merck nach Stumpf, Floridin XXF, Floridin XS, Bleicherde Merck, Kaolin nach Willstätter, Lloyds Reagenz, $Al(OH)_3$ frisch bereitet aus $AlCl_3$ mit Na_2CO_3 und mit $Ba(OH)_2$, Al_2O_3 techn. Riedel u. de Haën, Al_2O_3 puriss. Merck, Al_2O_3 nach Brockmann (Merck) bei pH 1,5–6,0 (durch HCl oder Essigsäure eingestellt) geschüttelt. Nur die beiden letztgenannten Adsorptionsmittel nahmen, am besten bei pH 3,0 bis 4,0, etwas mehr als Spuren auf. Quantitativ durchgemessen wurden nur Al_2O_3 Brockmann und Frankonit KL; ersteres, weil es die Guanidoglutarsäure, letzterer weil er die Guanidoessigsäure am besten adsorbiert.

	2 gr Al_2O_3 n. Brockmann		2 gr Frankonit KL	
	adsorb. mg.	pH des Filtrats	adsorb. mg.	pH des Filtrats
Guanidoglutarsäure	10	3,5	0,2	3,5
Guanidoessigsäure	0,15	3,5	10*	kongosauer
Kreatinin*	2,5	kongosauer	10	kongosauer

* Mündliche Mitteilung von Dr. Klinger.

Die Adsorbate lassen sich mit angesäuertem Wasser von pH 3,5 ohne Verlust waschen.

Eluiert wurde mit kalt gesättigter Barytlösung.

Adsorption und Elution aus Harn: 10 mg Guanidoglutarsäure gelöst in 20 cem 1:1 verdünntem Menschenharn, der auf das geeignetste pH von 3,5 gebracht war, wurde 4 mal mit 2 g Al_2O_3 Brockmann geschüttelt, bis Sakaguchi R. neg. Mit je 20 cem

Baryt musste 4 mal eluiert werden, bis Sakaguchi R. neg. Aus den vereinigten Filtraten wurde Ba^{++} mit SO_4^{--} entfernt; die Restlösung enthielt noch 5 mg = 50% Guanidosäure.

In einem anderen Modellversuch mit gleichen Mengen und Konzentrationen Guanidoglutarsäure und Harn wurde mit Frankonit KL bei PH 5 vorgereinigt. Unter diesen Bedingungen würde Guanidoessigsäure vollständig herausgenommen werden (s.o.), die natürlichen Harnfarbstoffe jedoch und die Guanidoglutarsäure wurden nur sehr wenig adsorbiert. Bei nachfolgender Adsorption mit Al_2O_3 n. Brockmann bei PH 3,5 und Elution mit Baryt wurden 75% der Einwage in der Lösung zurückerhalten.

Bei Vorreinigung des Harns mit Bleiacetat und H_2S geht nichts von beiden Guanidosäuren verloren. Als wir aber den störenden Harnstoff mit Alkohol zu entfernen versuchten, verloren wir auch 50% der in Alkohol unlöslichen Guanidosäuren.

Einwirkung von Diazomethan: Bereitet nach Gattermann-Wieland 24. Auflage 1936 S. 269. 500 mg Guanidoglutarsäure in 50 ccm eiskaltem abs. Methanol aufgeschlämmt, dazu portionsweise Diazomethan in Äther aus insgesamt 8 gr Nitrosomethylharnstoff. Nach 2 Tagen war die im Dunkeln aufbewahrte Lösung immer noch gelb gefärbt. Von sehr wenig Bodensatz wurde abfiltriert. Das i.V. bis auf 2 ccm eingeeengte Filtrat wurde mit der äquimolekularen Menge Oxalsäure (wasserfrei 0,2 gr in 5 ccm absol. Methanol gelöst) versetzt. Nach 2 tägigen Stehen im Kühlschrank wurden 49 mg Oxalat A (F_p 205°) abfiltriert (s.u.). Aus dem eingeeengten Filtrat liess sich mit Methanol ein neues Oxalat B₁ (F_p 144°, 35 mg) gewinnen und auf erneuten Zusatz von Oxalsäure weitere 100 mg B₂ vom F_p 146°. Oxalat B feine Nadeln, lackmussauer. Zur Analyse wurde bei 80° über P_2O_5 bei 0,3 mm getrocknet.

- B₁ 42,205 mg; 6,410 CO_2 ; 1,960 H_2O ; 4,506 mg; 0,589 ccm N_2 23°; 751 mm; 5,880 mg; 4,750 AgJ aus OCH_3 und 4,340 AgJ aus NCH_3 (nicht korrigiert)
- B₂ 4,328 mg; 6,570 CO_2 ; 1,980 H_2O ; 4,543 mg; 6,890 CO_2 ; 2,100 H_2O ; 4,860 mg; 0,603 ccm N_2 23°, 756 mm; 4,050 mg; 0,502 ccm N_2 23°, 756 mm; 10,590 mg; AgJ aus OCH_3 (NCH_3 nicht untersucht); 8,105 mg 6,330 AgJ aus OCH_3

	C	H	N	OCH ₃	NCH ₃
Für C ₈ H ₁₃ O ₃ N ₃ ·C ₂ H ₂ O ₄ (289) ber.	41,5	5,2	14,5	10,75	5,2
B ₁ gef.	41,59	5,22	14,89	10,67	4,72 uncorr
B ₂	41,40	5,12	14,23	10,15	5,22 corr
	41,35	5,17	14,22	10,31	

Sakaguchi R. neg.: wenn Substanz einige Stunden in 10% NaOH gelöst bei Zimmer Temp. steht, Sakaguchi-R. pos. Welches Carboxyl verestert worden ist, ob Pyrrolidon- oder Hydantoin-Ring vorliegt, lässt sich nicht sagen; beide Formen enthalten ein asymmetrisches disubstituiertes Guanidin und ermangeln daher der Sakaguchi, R. Der Sauerstoff an C(4) begünstigt den Eintritt von CH₃ an N(3). Bei Ringaufspaltung durch Alkali entsteht bei beiden Formen ein symmetrisch disubstituiertes Guanidin, das wie erwartet positive Reaktion zeigt.

Oxalat A entsteht mit besserer Ausbeute und fast allein, wenn man feinst gepulverte scharf getrocknete Guanidoglutarsäure mit mehr Methanol aufschlämmt und nicht so lange mit überschüssigem Diazomethan stehen lässt, dieses auch nicht wie eben durch Abdestillieren entfernt, sondern durch methanolische Lösung von wasserfreier Oxalsäure zersetzt. 1,9 gr Guanidoglutarsäure in 80 ccm Methanol wirkten auf Diazomethan aus 2 mal 5 gr Nitrosomethylharnstoff in wenig Äther 24 Stunden lang ein. Dann wurde mit 0,9 gr Oxalsäure zersetzt. Es kristallisierten 0,76 gr noch oxalsäurehaltiges Rohprodukt aus, das mehrfach aus heissem Methanol umkristallisiert wurde. Breite schräge Prismen (F 209° unter Zers.; uncorr.).

H ₂ O; 3,770 mg: 0,599 ccm N ₂ 23°. 755 mm; 5,120 mg: 5,220 AgJ für OCH ₃				
Für (C ₇ H ₁₁ O ₃ N ₃) ₂ ·C ₂ H ₂ O ₄ (460) ber.	C 41,72	H 5,26	N 18,26	OCH ₃ 13,48
gef.	41,67	5,19	18,20	13,47

Phenacylester nach Rather u. Reid (1919).

Die klare Lösung von 0,94 gr=1/200 Mol Guanidoglutarsäure und 0,53 gr=1/200 Mol Na₂CO₃ in 5 ccm Wasser wurde mit 2,0 gr =1/100 Mol ω -Bromacetophenon in 10 ccm 96%igem Äthanol auf kochendem Wasserbad 2 Std. lang gehalten. Die braune Lösung wurde dann mit 6 ccm Äthanol auf einen Alkoholgehalt von 73% und im Kühlschrank zur Kristallisation gebracht. Die Krystalle

wurden mit kaltem Wasser und mit Äther gründlich gewaschen (0,20 gr) und dann 2 mal aus 15 ccm 65%igem wässerigen Äthanol umkristallisiert 0,1 gr; F_p 246°; sehr lang ausgezogene rechtwinklige Prismen: Beilstein neg., Sakaguchi-R. neg., nach Einwirkung von NaOH pos.;

4,258 mg: 9'080 CO ₂ ; 1,980 H ₂ O; 4,425 mg: 0,568 ccm N ₂ 23°, 745 mm;			
Für C ₁₄ H ₁₅ O ₄ N ₃ (289,1) ber:	C 58,11	H 5,23	N 14,53
gef:	58,16	5,20	14,49

Die Analyse stimmt auf den Mono-phenacylester eines Anhydrids von Guanidoglutarsäure. Er löst sich in HCl-haltigem Methanol nicht leicht.

Anhydrid der α -Guanidoglutarsäure.

1,846 g feinst gepulverte und bei 80° im Hochvak. getrocknete Säure, in horizontal liegendem Reagenzglas ausgebreitet, verloren bei 110° und 0,3 mm über P₂O₅ in 47 Std. die für 1 H₂O berechnete Gewichtsmenge und wurden nach insgesamt 72,5 Std. gewichtskonstant. Ausbeute 1,645 gr=98,5% d. Th. Aus 30 ccm heissem Wasser 1,3 gr=79% gradwinklige Prismen; F_p 245° unter Zersetzung. Wenig löslich in kaltem Wasser, gut löslich in heissem; unlöslich in neutralen organischen Lösungsmitteln, leicht l. in wässrigen und organischen Säuren und Laugen. Kein schwer lösl. Cu- und Ag-Salz. Sakaguchi-R. neg., nach kurzer Einwirkung von 10% NaOH schon pos.; Weber-Tiegs (1936), pos. Jaffe neg., Benedict-Behre neg.

4,585 mg: 7,040 CO ₂ ; 2,170 H ₂ O; 3,775 mg: 0,798 ccm N ₂ 22°, 754 mm;			
Für C ₆ H ₉ O ₃ N ₃ (171,1) ber.	C 42,10	H 5,30	N 24,56
gef.	41,85	5,29	24,27

Methylesterchlorhydrat.

0,34 g Anhydrid in 20 ccm 3% HCl haltigem absol. Methanol gelöst. 24 Std. bei Zimmertemp. stehen gelassen. Klare Lösung i.V. verdunstet, Rückstand mit absol. Äther ausgezogen. Dabei wurde er kristallin, (F_p 135°) nicht hygroskopisch, sehr leich lösl. in Methanol, nicht oder nur sehr wenig lösl. in Äther, Chloroform, Essigester. I und II aus verschiedenen Darstellungen. Sakaguchi R. neg., nach Einwirkung von NaOH pos.

I	4,545 mg:	6,290 CO ₂ ;	2,170 H ₂ O;	4,150 mg;	0,675 ccm N ₂ 21°, 751 mm;
	9,240 mg:	5,960 AgCl;	II	4,655 mg:	6,440 CO ₂ ;
				2,150 H ₂ O;	4,270 mg:
				0,699 ccm N ₂ 21° 751 mm;	10,615 mg:
				6,880 AgCl;	6,860 mg:
				7,020 AgJ;	
Für	C ₇ H ₁₁ O ₃ N ₃ ·HCl (207,6) ber.	C 37,92	H 5,46	N 18,96	Cl 16,01
		OCH ₃ 13,99			
	I gef.	37,68	5,34	18,66	15,99
	II	37,72	5,17	18,79	16,03
					13,52

Phenacylester.

Bei der Umsetzung äquimolekularer Mengen erhält man Nadeln, die nach gründlichem Waschen mit Wasser und Äther und Auskochen mit Essigester von möglichen Verunreinigungen befreit sich in heissem Wasser zersetzen und aus anderen Lösungsmitteln nicht umkristallisiert werden konnten. Wir halten das Rohprodukt (F_p 203°) nach seiner analytischen Zusammensetzung für ein Gemisch von unverändertem Anhydrid und Phenacylester. In HCl haltigem Methanol löst es sich spielend. Mit absol. Äther fällt ein Chlorhydrat— unter den gleichen Verhältnissen gibt Anhydrid allein keine Fällung—, das keine Sakaguchi R. zeigt, erst nach längerer Einwirkung von 10% NaOH wird sie positiv. Die Substanz ist also sicher verschieden von dem S. 12 genannten Phenacylester-anhydrid.

Ureidosäuren.

Diphenacylester der α -Ureidoglutarsäure.

Darst. der analysenreinen Säure (F_p 156°) nach Lippich (1908) (S. 2967) aus Glutaminsäure und Harnstoff (nach L. F_p 150°); 0,48 g=1/400 Mol Ureidoglutarsäure, 0,26 g=1/400 Mol Na₂CO₃, 1,0 g=1/2 Mol Bromacetophenon in 7,5 ccm 63%igem Äthanol 2 Std. gekocht. Beim Abkühlen Gallerte, die auf Ton getrocknet wurde. Tonrückstand mit Äther extrahiert. Aus dem ätherunlöslichen Anteil Reste des NaBr mit Essigester abgetrennt. Der Rückstand des Essigester-auszugs aus 75 ccm 33%igem wässer. Methanol kristallisiert. Ausbeute 59% d. Th. Sehr dünne lange Nadeln, in Büscheln zusammengepackt (F_p 136,5° unter Zers.). Zur Analyse über P₂O₅ bei 80° und 0,3 mm getrocknet.

4,472 mg:	10,130 CO ₂ ;	1,990 H ₂ O;	4,203 mg:	0,246 ccm N ₂ 21° 757mm;
Für	C ₂₂ H ₂₂ O ₇ N ₂ (426,2) ber.	C 61,94	H 5,20	N 6,57
	gef.	61,76	4,98	6,77

Anhydrid der α -Ureidoglutarsäure.

Entsprechend der Vorschrift von Lippich: 1,905 g der Säure in 100 ccm $n/2$ H_2SO_4 im kochenden Wasserbad 5 Std. gehalten, d. h. bis die Lösung nicht mehr mit p -Dimethyl-aminobenzaldehyd reagierte. Nach Zusatz der berechneten Menge Ba-acetat und Einengen des Filtrats i. V. kristallisierten farblose, doppelbrechende sehr langgestreckte Prismen, die abgesaugt und auf der Nutsche mit Äthanol und Äther gewaschen wurden $0,94 + 0,23 = 1,17$ g = 67,4% d. Th. F_p 186°. Aus Wasser umkristallisierbar, in Äthanol und Methanol löslich, in Aceton wenig löslich, in Äther unlöslich.

4,710 mg: 7,240 CO_2 ; 1,940 H_2O ; 4,628 mg: 0,667 ccm N_2 24°, 750 mm;			
Für $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4\text{N}_2$ (172) ber.	C 41,86	H 4,66	N 16,29
gef.	41,92	4,61	16,35

Phenacylmonoester des Anhydrids der α -Ureidoglutarsäure.

Darst. des analysenreinen Anhydrids aus der Säure nach Lippich (l. c. S. 2971). Umsetzung mit Bromacetophenon in äquimolaren Mengen nach Vorschrift. Ausbeute 60% roh, F 142°. Zur weiteren Reinigung aus Essigester umkristallisieren, indem sich der Ester auch in der Kälte ziemlich gut löst. F_p 145°, wetzsteinförmig. Zur Analyse 80° P_2O_5 , 0,3 mm.

4,038 mg: 8,570 CO_2 ; 1,700 H_2O ; 4,750 mg: 0,392 ccm N_2 20° 757 mm;			
Für $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{N}_2$ (290,1) ber.	C 57,84	H 4,86	N 9,66
gef.	57,88	4,71	9,60

Phenacylester der Ureidoessigsäure.

Aus den Komponenten nach Vorschrift. Ausbeute roh 45% d. Th. (F_p 161°). Aus 50 ccm Aceton umkristallisiert mit 41% Ausbeute d. Th. Prismen, F_p 162°, wenig l. in kaltem Wasser, leichter in heissem, beim Abkühlen auch kristallisierend, nicht lösl. in Äther.

4,468 mg: 9,180 CO_2 ; 1,960 H_2O ; 4,813 mg: 0,509 ccm N_2 22°, 751 mm;			
Für $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{N}_2$ (236,1) ber.	C 55,91	H 5,12	N 11,87
gef.	55,98	4,91	11,92

SCHRIFTTUM.

Ackermann (1913): Z. f. Biol., 63, 81.

- Ackermann (1936): H.-S., **239**, 231.
Baum (1908): Biochem. Z., **26**, 330.
Beard u. Barnes (1931): J. Biol. Chem., **94**, 49.
Beard u. Boguess (1935): Americ. J. Physiol., **113**, 647.
Dieselben (1936): J. Biol. Chem., **114**, 771.
Benedict S. R. u. Behre (1936): J. Biol. Chem., **114**, 515.
Bergmann u. Zervas (1927): H.-S., **172**, 277; **173**, 80.
Bodansky (1936): J. Biol. Chem., **112**, 615.
Derselbe (1936): J. Biol. Chem., **115**, 641.
Braestrup (1936): Acta Med. Skand., **89**, 231.
Chanutin (1930): J. Biol. Chem., **89**, 765.
Freiberg u. West (1933): J. Biol. Chem., **101**, 449.
Gansser (1909): H.-S., **61**, 16.
Hugouenau u. Florence (1920): Bull. Soc. Chim. France (4), **27**, 750.
Kapfhammer u. Müller (1934): H.-S., **225**, 1.
Krebs u. Henseleit (1932): H.-S., **210**, 33.
Lippich (1908): Ber., **41**, 2953.
Marples u. Levine (1936): Americ. J. of Diseases of Children, **51**, 30.
Milhorat (1933): Dtsch. A. f. klin. Med., **174**, 487.
Mitchell u. Hamilton (1929): Biochemistry of the Amino Acids, New York.
Rather u. Reid (1919): J. Americ. Chem. Soc., **41**, 75.
Richardson (1934): Medical Clinics of North America, 731.
Richardson u. Shorr (1935): Transactions of the Association of American Physicians, **1**, 156.
Rose (1933/1935): Ann. Rev. Biochem., **2**, 187; **4**, 243.
Shorr, Richardson u. Wolff (1933): Proc. Soc. Ex. Biol. Med., **31**, 207.
Stieglitz u. McKee (1900): Ber., **33**, 1517.
Sullivan (1935/1936): Proc. Soc. Biol. Med., **33**, 106; J. Biol. Chem., **116**, 233.
Sulivian, Hess u. Irreverre (1936): Journ. Biol. Chem., **114**, 633.
Terroine (1936): Arch. internat. Physiol., **42**, 381.
Thompson (1905/6): J. Physiol., **33**, 106.
Derselbe (1917): J. Physiol., **51**, 111.
Derselbe (1917): Biochem. J., **11**, 307.
Thomas (1934): Deutsche med. Wschrft., 558.
Thomas u. Goerne (1914): H.-S., **92**, 163.
Thomas, Kapfhammer u. Flaschenträger (1922): H.-S., **124**, 75.
Thomas, Milhorat u. Techner (1933): H.-S., **214**, 121.
Weber (1934): Proc. Soc. Biol. med., **32**, 172.
Weber (1936): J. Biol. Chem., **114**, Proc. 8 CVII.
Weber-Tiegs s. George Hunter (1936): Biochem. J., **30**, 1188.

THE DISINTEGRATION OF METHYLATED GLUCOSES IN ALKALINE MEDIUM.

BY

N. ARIYAMA AND T. KITASATO.

(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical College.)

(Received for publication, Feb. 3, 1937)

The chemical reactions by which the degradation of sugar molecules in alkaline medium is accomplished were interpreted by Nef as proceeding down the carbon chain with the formation of 1,2-, 2,3- and 3,4- di-enols, followed by the successive disintegration of the chain at the points of double bond. The validity of this theory has been strengthened by a series of experiments in which the formation of di-enols was blocked by etherifying and thus stabilizing hydroxyl groups of sugar molecules with methyl groups. It has been repeatedly noticed by the investigators, who synthesized the methylated sugars, that these sugars acquire greater stability to alkalis, oxidizing reagents, acids and enzymes than the corresponding unsubstituted sugars. However, systematic studies of this property of the methylated sugars have been undertaken only recently by Lewis and his co-workers, and Sobotka. Gustus and Lewis (1927) isolated predominantly acids of one and of five carbon atoms as the oxidation-products of 2,3,4,6-tetramethyl glucose with alkaline hydrogen peroxide. Wolf from and Lewis (1928) observed, that the Lobry de Bruyn-van Ekenstein interconversion of 2,3,4,6-tetramethyl glucose in dilute alkaline solution was confined only to the reciprocal transformation of glucose and mannose, no keto-sugar being formed. Greene and Lewis (1928), and Gross and Lewis (1931) demonstrated the same type of transformation in tetramethyl mannose and trimethyl xylose. The results of these experiments were explained by Lewis and his co-workers on the assumption that a labile hydrogen atom at C_2 was replaced by a stable methyl

group and, consequently, only the 1,2-di-enol could be formed.

Sobotka (1926) compared the resistance of a series of methylated glucoses (3-monomethyl, 2,3-dimethyl, 3,5,6-trimethyl, 2,3,4,6-tetramethyl and 2,3,4,5,6-pentamethyl glucose) against oxidation by the Lehmann-Maquetenne and Bertrand procedures. From the results of the experiments, he established the following rule concerning the influence of the position and number of methyl groups on the stability of the methylated glucoses: Enolization and thus oxidation is blocked more markedly with the increase of the number of methyl groups and with the proximity of one of them to C₁. Though this rule is not rigidly operative, it seems to explain to a certain extent the relation between enolization and methylation of sugar molecules.

One of the obstacles encountered in the experiments with methylated sugars is the inadequacy of the measuring methods of their reducing power. As noticed by Purdie and Irvine (1904), and Wolform and Lewis (1928), the methylated sugars continue to reduce oxidizing reagents even after the completion of oxidation of the unsubstituted sugars. This phenomenon may be partly, at least, due to the gradual liberation of the substituting methyl groups by the alkalinity of the sugar reagents, and to the difficulty with which the enolization takes place. Thus it is impossible to determine the reducing power of the methylated sugars with accuracy by the ordinary measuring methods.

It can be anticipated that the number and position of methyl groups may exert influence on the velocity or the facility of the enolization. If so, the ordinary procedures which show approximately the final values of the reducing capacities, are not well adapted to a decision of this finer influence of the methyl group. The only way may be the slowing down of the speed of degradation of the molecules at lower alkalinity or temperature, so as to be able to make closer observation at the initial period of the reactions. Certain methylated sugars may reduce oxidizing reagents more rapidly but less profoundly, and other sugars may reduce the reagents more slowly but to a further degree.

In the present experiments the methylated sugars were

oxidized with various sugar reagents under milder conditions than ever attempted before, and the courses of oxidation were followed potentiometrically or iodometrically. For reference the reducing power of the substituted sugars was determined by ordinary methods, but with oxidizing reagents other than copper, such as iron and mercury, as well as with the copper reagent which has a lower alkalinity than the Fehling or Bertrand reagent. Thunberg's methylene blue method was also applied to some methylated sugars. Furthermore the Lobry de Bruyn-van Ekenstein transformation of some methylated sugars was also examined. The methylated sugars used were 2-monomethyl, 3-monomethyl, 6-monomethyl, 2,3-dimethyl, 2,3,4-trimethyl, 3,5,6-trimethyl, 2,3,5,6-tetramethyl, 2,3,4,6-tetramethyl and 2,3,4,5,6-pentamethyl glucose.

EXPERIMENTAL.

The methylated sugars were prepared in the following ways. 2-Monomethyl glucose: *Brigl and Schinle* (1930), 3-monomethyl glucose: *Levene and Meyer* (1924), 6-monomethyl glucose: *Ohle and Vargha* (1929) or *Levene and Raymond* (1932), 2,3-dimethyl glucose: *Irvine and Scott* (1913), 2,3,4-trimethyl glucose: *Purdie and Bridgett* (1903), 3,5,6-trimethyl glucose: *Anderson, Charlton and Haworth* (1929), 2,3,5,6-tetramethyl glucose: ditto, 2,3,4,6-tetramethyl glucose: hydrolyzing the tetramethyl methylglucoside prepared by the *Haworth and Leitch* method (1918), 2,3,4,5,6-pentamethyl glucose: *Levene and Meyer* (1926). Among the methylated sugars prepared, 2-monomethyl, 3-monomethyl, 6-monomethyl, and 2,3,4,6-tetramethyl glucoses were obtained in the purest state. The physical constants of these crystalline preparations are shown in Table I. Other sugars which are syrupy for the most part, were, strictly speaking, not perfectly pure, and the results of the experiments in which these sugars were used, are to be submitted for reference only.

The reducing power of the methylated sugars was determined by the copper sulphate method of *Somogyi* (1926), the

TABLE I.
Physical Constants of Methylated Sugars.

Sugar	Melting point	Optical rotation
2-Monomethyl glucose	156°C. (uncorr.)	$[\alpha]_D^{21} = +67.0^\circ$
3- " "	160.5° (")	$[\alpha]_D^{23} = +55.2^\circ$
6- " "	137.5° (")	$[\alpha]_D^{23} = +58.0^\circ$
2,3,4,6-Tetramethyl glucose	88° (")	$[\alpha]_D^{22} = +81.4^\circ$

ferricyanide method of Hanes (1929), and the mercuric iodide method of Jonesco-Matinet and Vitner (1930).

Reducing Power of Methylated Sugars.

As mentioned in the introductory part, the constant reducing power of the methylated sugars cannot be fixed with exactness by ordinary measuring methods. We found, moreover, that the relative values of reducing power varied with the concentration of the methylated sugars; the values were lower at the lower concentration of the sugars. Nevertheless, in view of the importance of the deduction of Sobotka on the oxidation of methylated sugars, we amplified his experiments, increasing the kind of methylated sugars and using other measuring methods. The methylated sugars and the measuring methods employed have been mentioned above. The concentration of the sugar solutions was 0.002 M in the Hanes and the Somogyi method, and 200 mg.% in the Jonesco-Matinet and Vitner method. The results are listed in Table II, the relative values of the reducing power being referred to that of glucose=100. The values for methylated sugars which were determined by the Bertrand method and reported here and there in the literature, are summarized and arranged in the table together with our results.

It will be noticed in the table that the relative values of the reducing power of the sugars keep nearly the same order with different methods, though they differ in their absolute values. The reducing capacities of the sugars determined by the Somogyi method, in which the alkalinity is much lower than in the

TABLE II.
Reducing Power of Methylated Sugars.

Sugar	I Hanes		II Somogyi		III Jonesco- Matinet and Vitner	IV Bertrand
	15 min.	25 min.	15 min.	25 min.		
Glucose	100	100	100	100	100	100
2-Monomethyl glucose	72	75	± 0	8	41	(The present writers)
3-Monomethyl glucose	112	117	43	43	82	68 (Sobotka* ₁)
6-Monomethyl glucose	98	98	86	95	83	82 (Ohle u. Vargha* ₂)
2,3-Dimethyl glucose	60	62	13	14	44	36 (Sobotka)
2,3,4-Trimethyl glucose	62	63	14	15	44	11 (Zemplén and Braun* ₃)
3,5,6-Trimethyl glucose	71	72	23	24	44	38 (Sobotka)
2,3,4,6-Tetramethyl glucose	41	43	17	20	34	23 (Sobotka)
2,3,5,6-Tetramethyl glucose	19	21	13	18	24	14 (Zemplén and Braun)
2,3,4,5,6-Penta- methyl glucose	43	44	17	18	15	30 (Sobotka)

*₁ Sobotka, H. (1926): J. Biol. Chem., **69**, 267.

*₂ Ohle, H. and Vargha, L. (1929): Ber. deutsch. chem. Ges., **62**, 2435.

*₃ Zemplén, G. and Braun, G. (1925): Ber. deutsch. chem. Ges., **58**, 2566.

Bertrand method, are low in general; 2-monomethyl glucose scarcely reduces the copper reagents. The Hanes method shows the highest values; the reducing power of 3-monomethyl glucose is even higher than that of free glucose. The Jonesco-Matinet and Vitner method stands in an intermediate position.

Much has been clarified by determining the reducing power of 2-monomethyl glucose. Comparing the reducing power of 2-, 3-, and 6-monomethyl glucoses in II-IV, it is easily understood that the remoter the methyl group from C₁, the higher the reducing power. The introduction of one methyl group into C₂ gives the sugar a resistance which is by no means weaker than that

enhanced by the simultaneous substitution of hydrogen atoms at C₃, C₅ and C₆ with three methyl groups. It is indicated in the results obtained with the use of the ferricyanide reagent, that the reducing capacities of methylated sugars decrease regularly with the number of methyl groups. The reducing capacities become smaller in the order named: 2-monomethyl, 2,3-dimethyl, 2,3,4-trimethyl and 2,3,4,6-tetramethyl glucose. Thus it may be said that Sobotka's rule is applicable, in principle, to methylated sugars, at least when they are oxidized by the common procedures of sugar determination. Under close examination, there are, however, many exceptions, especially with copper reagents. 2-Monomethyl glucose has lower reducing power than 2,3-dimethyl glucose. The same phenomenon is observed with the mercury reagent. It must be taken into consideration that the purity of the latter sugar derivative is inferior to the former in our experiments and in Sobotka's as well, in which the β -form of the dimethyl glucose was used. As found by Sobotka with the Lehmann-Maquet procedure, 2,3-dimethyl glucose is less active than 2,3,4,6-tetramethyl glucose in reducing the Somogyi reagent, while the regularity of the rule is kept in the case of the mercury method. The reducing power of the two tetramethyl glucoses and the pentamethyl glucose is perplexing and cannot be simply interpreted by the Sobotka rule. It is shown by all the measuring methods that the reducing power of 2,3,5,6-tetramethyl glucose is far lower than that of 2,3,4,6-tetramethyl glucose, and that pentamethyl glucose does not fall below 2,3,4,6-tetramethyl glucose in reducing power. The presence of ring structure with different resistance in sugar molecules was considered by Sobotka as one of the possible reasons for the exceptional behavior of the sugars.

Oxidation of Methylated Sugars Under Milder Conditions.

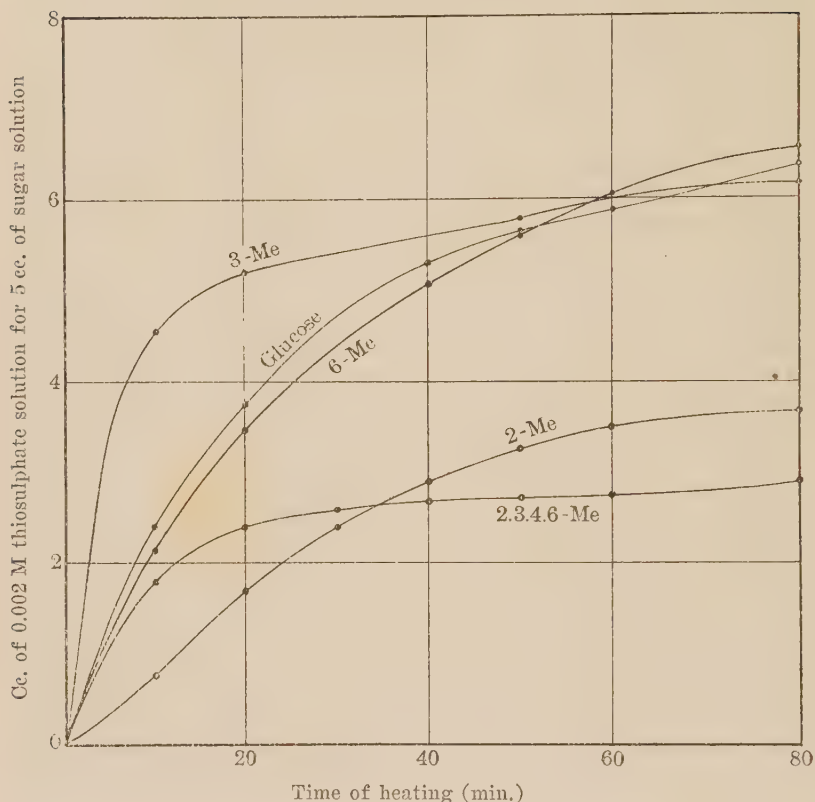
Turning now to the more detailed characteristics of oxidation of methylated sugars, the sugars were oxidized under milder conditions, and the initial steps of the disintegration of the sugar molecules were observed.

Owing to its sensitivity to methylated sugars, ferricyanide

was used as an oxidant for the present purpose. The curves in Fig. 1 represent the courses of oxidation of methylated sugars determined periodically by the Hanes procedure at 70°C. Free glucose and 6-monomethyl glucose are oxidized at the same velocity, and it has been shown in Table II that their final values are almost equal. These facts indicate that the presence of a methyl group at C₆ has practically no influence on the stability of the glucose molecule. 2-Monomethyl glucose is oxidized quite slowly, showing acquisition of great resistance by the etherification at C₂. The initial velocity of oxidation of 3-monomethyl glucose is extremely great, but it is later so retarded that the curve intersects that of unsubstituted glucose. The oxidation of 2,3,4,6-tetramethyl glucose occurs with a initial velocity which exceeds that of 2-monomethyl glucose, but it diminishes progressively and is surpassed soon afterwards by the latter. The impurity of the sugar samples is not responsible for this anomalous behavior of 3-monomethyl glucose and tetramethyl glucose, since the sugars were put through a sufficiently rigorous purification. It is thus demonstrated that the position and number of the methyl groups do not always control regularly the enolization and disintegration of a sugar molecule.

In order to obtain more accurate information about this point the reducing capacities of the methylated sugars were measured by means of a potentiometer. The conditions of experiments were as follows. 20 cc. of 0.25 M potassium ferrieyanide solution, 10 cc. of N potassium hydroxide solution and 5 cc. of 0.1 M sugar solutions were mixed, diluted to 50 cc., a bright gold electrode was inserted, and potentials ($E_{\text{obs.}}$) were read against a saturated KCl-calomel electrode at 30.5°C., liquid junction potentials being neglected. Air was excluded by a layer of paraffin. The potentials were well stabilized and quite reproducible as soon as a trace of ferrocyanide was formed from ferrieyanide. The curves in Fig. 2 which were prepared by plotting hourly potential readings, admit of an easy interpretation of the results. The methylated sugars behaved to this method just in the same manner as to the Hanes procedure at 70°C. The curves of unsubstituted glucose and 6-

Fig. 1. Reducing power of methylated sugars determined by Hanes' method at 70°C.

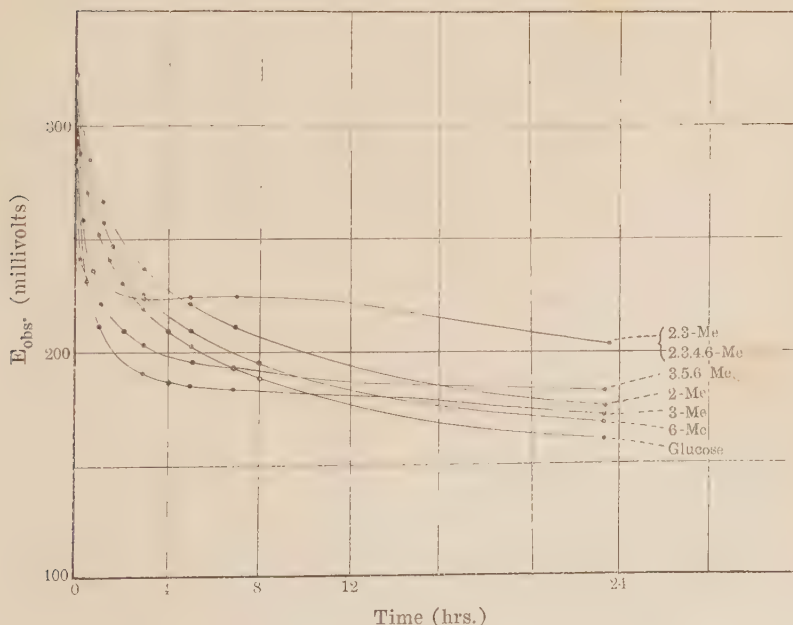


monomethyl glucose run close together. The oxidation of 2-monomethyl glucose took place at the slowest rate. 3-Monomethyl glucose and *n*-tetramethyl glucose were oxidized in the initial period at greater velocities than unsubstituted glucose and 2-monomethyl glucose respectively. However, the velocities decreased later very rapidly, and this was especially the case with tetramethyl glucose. The experiments were extended to 2,3-dimethyl glucose and 3,5,6-trimethyl glucose. The velocity of oxidation of the dimethyl glucose was scarcely greater than that of tetramethyl glucose. Trimethyl glucose, which was a furanose, showed a con-

siderably higher velocity at the initial period, then it occupied the intermediate situation between free glucose and 3-monomethyl glucose, and later the velocity became lower than that of glucose. It may be added that methylated sugars were coloured brown very rapidly at the alkalinity of the present experiments (0.2 M KOH). 2-Monomethyl, 2,3-dimethyl, 2,3,4-trimethyl, 3,5,6-trimethyl, 2,3,4,6-tetramethyl glucose were coloured within a few minutes. 3-Monomethyl glucose became tinged after 5 minutes. 6-Monomethyl glucose and free glucose remained colourless for a long time. Purdie and Irvine (1904) noticed the solution of *n*-tetramethyl glucose becoming dark brown when it was heated with Fehling's solution. This may be due to the brown-coloring of the sugar molecules which did not suffer so deep-seated change by oxidation.

Thunberg's method of methylene blue-decolorization offered another method for the demonstration of reactivity of 3-monome-

Fig. 2. Potentials of methylated sugars in alkaline ferrieyanide solution.



thyl glucose. As shown in Table III, this sugar decolorized the dye stuff with decidedly greater rapidity than unsubstituted glucose and 6-monomethyl glucose. 2-Monomethyl glucose and tetramethyl glucose did not decolorize the dye stuff for a very long while under the conditions of the experiments. 3,5,6-Trimethyl glucose decolorized methylene blue instantaneously. This can be expected from its furanose structure.

TABLE III.
Decolorization of Methylene Blue with Methylated Sugars
(Thunberg's Method)

Condition			Time of decolorization (min.)						
			Glucose	6-Me	3-Me	3,5,6-Me	2-Me	2,3-Me	2,3,4,6-Me
I	0.02 M suger solutino	5 cc.	7.1	6.5	2.0	Instan- taneously	Not decolorized	Not decolorized	Not decolorized
	1:5000 Methylene blue	3 cc.							
	N KOH	2 cc.							
	30.5°C.								
II	0.02 M suger solution	5 cc.	75	71	16	Instan- taneously	Not decolorized	Not decolorized	Not decolorized
	1:5000 Methylene blue	2 cc.							
	M Na ₂ CO ₃	2 cc.							
	H ₂ O	1 cc.							
	30.5°C.								

The following scheme illustrates also the sensitivity of 3-monomethyl glucose. Using tetramethyl glucose, Lewis and his co-worker pointed out that the Lobry de Bruyn-van Ekenstein transformation was confined to the interconversion between glucose and mannose; no ketose was formed. This finding was confirmed by us more clearly with the use of 2-monomethyl glucose. After treating the sugar at various alkalinities (pH 9.5–11.5) for varying lengths of time at 37°C., we found no difference between the quantities of the sugar determined by the aldose measuring method of Willstätter-Schudel and by the ordinary sugar methods such as the Hanes procedure (heated accurately for 15 minutes). This indicates that ketose cannot be transformed from aldose. The

iodometric method of aldose determination modified by Wolfrom and Lewis (1928) was found to have no advantage over the original Willstätter-Schudel method. Strepkov's procedure (1936) of microdetermination of fructose in the presence of glucose did not work so accurately as mentioned by the author; the influence of glucose could not be avoided completely under strictly the same conditions as those described.

Lewis' finding can be developed to the expectation that 3-monomethyl glucose, contrary to 2-monomethyl glucose, may be transformed freely into mannose and fructose. With this view in mind we examined the interconversion of 3-monomethyl glucose alongside with unsubstituted glucose at pII 10.1 ($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$) which was found to be the optimum hydrogen-ion concentration for the transformation of free glucose under our experimental conditions. Ten cc. of 0.1 M solution of 3-monomethyl glucose or free glucose were mixed with 40 cc. of the buffer solution and kept at 37°C, a few drops of toluene being added. The quantities of the sugars were determined at intervals of several days with the procedures of Willstätter-Schudel and Hanes (heated accurately for 15 minutes). It is shown in Table IV that the rate of the decrease of reducing power determined by either of the two methods was decidedly greater in 3-monomethyl glucose than in free glucose. Thus it is revealed that 3-monomethyl glucose has greater alkali-susceptibility than free glucose. The difference in the quantities of the sugars determined at a given time by two methods was greater in the former sugar. This difference means the transformation of glucose into fructose. Seliwanoff's reaction for fructose was also far more strongly positive in the methylated sugar. These results seem to indicate greater alkali-susceptibility and a higher yield of fructose in 3-monomethyl glucose as compared with unsubstituted glucose.

By combining the results obtained from many different types of experiments, it appears that in spite of its relatively close situation to C_1 , the presence of a methyl group at C_3 does not exert any particularly retarding influence on the initial velocity of the disintegration of sugar molecules. This may be explained on the

TABLE IV.

Lobry de Bruyn-van Ekenstein's Transformation of 3-Monomethyl Glucose.
In 100 cc.:—

376 mg. of 3-monomethyl glucose or 396 mg. of glucose + 80 cc.
of $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ buffer solution (pH 10.1). 37°C.

Sugar	Time of incubation	Quantity of sugar (mg. in 100 cc.)			
		I Total sugar in terms of glucose equivalent (Hanes)	II Aldose (Willstätter- Schudel)	III Fructose formed (I-II)	IV Selivanoff's reaction
3-Monomethyl glucose	1 hour	364	345	19	±
	2 days	308	186	122	+++
	4 days	208	122	86	++
Glucose	1 hour	400	398	±0	—
	2 days	390	346	44	+
	3 days	380	324	56	+

ground that the methyl group at C_3 may not exert strong influence on the formation of 1,2-di-enol which is the first step of the degradation of sugar molecules. The reason why the sugars which are methylated at C_3 show unexpectedly high susceptibility at the initial period cannot be determined in the light of our present knowledge of methylated sugars, except 3,5,6-trimethyl glucose which has 1:4-oxygen ring. Other methylated sugars are understood to have 1:5-oxygen ring. Though 3-monomethyl glucose is derived from di-acetone glucose which has furanose structure, Anderson, Charlton and Haworth (1929) gave to this methylated sugar a pyranose structure, since the sugar was converted to 2,3,4,6-tetramethyl glucose on complete methylation. Thus 3-monomethyl glucose was interpreted by the investigators to be formed from the furanose as the result of its ring-displacement.

When the full reducing capacities of methylated sugars are dealt with, the sugars which are etherified at C_3 may show lower values than that of unsubstituted glucose, since the methyl group at C_3 may block the further enolization of the sugar molecule.

Oxidation of Methylated Sugar with Periodic Acid.

Fleury and Lange (1932, 1933) found that periodic acid which was first used by Malaprade (1928) for the oxidation of polyalcohols, oxidized glucose, yielding a mol of formaldehyde and 5 mols of formic acid per mol of the sugar. They assumed that the oxidation with periodic acid was specific for α -glycols, and that formaldehyde was produced from the primary alcoholic group and formic acid from the secondary alcoholic groups. This assumption was partly confirmed by Karrer and Pfaehler (1934). A mol of formaldehyde was produced from a mol of glucose only in the presence of excess of periodic acid (1 mol sugar: 5 mols HIO_4). This was interpreted by them as indicating that the primary point of attack of periodic acid was not between C_5 and C_6 but at other places, and that formaldehyde might be formed secondarily from the primary oxidation-product.

We examined the influence of the number and position of methyl groups in the glucose molecule on its oxidation with periodic acid. The experimental conditions were similar to those of Karrer and Pfaehler. 1/6000 mol sugars (glucose: 30 mg.) were added with 1/1000 mol periodic acid (10 cc. of 0.1 M solution), 5 cc. of 20% sulphuric acid and 10 cc. of water. After standing for $11\frac{1}{2}$ hours or longer at room temperature, the formaldehyde formed was distilled by the Criege method (1932) and determined by the dimedon method. The results are listed in Table V. The average yield of formaldehyde produced from glucose was 91.2% of the theoretical value under the experimental conditions. 6-Monomethyl glucose and 2.3.4.6-tetramethyl glucose did not form formaldehyde at all, showing the indispensability of the presence of a primary alcoholic group for the production of formaldehyde. In other methylated sugars the yield of formaldehyde decreased with the proximity of the position of the methyl group to C_6 and with the increase of the number of methyl groups. It is thus conceivable that the presence of a methyl group in the sugar molecule may exert some influence on the facility of the oxidative detachment of the primary alcoholic group. The finding of Euler,

Karrer and Becker (1936) that ribose-3-phosphoric acid yielded formaldehyde in an amount which corresponded only to 60% of the theoretical value may be due to the inhibitory influence of the estrification at C₃ on the production of formaldehyde.

TABLE V.
Production of Formaldehyde from Methylated Sugars with Periodic Acid.

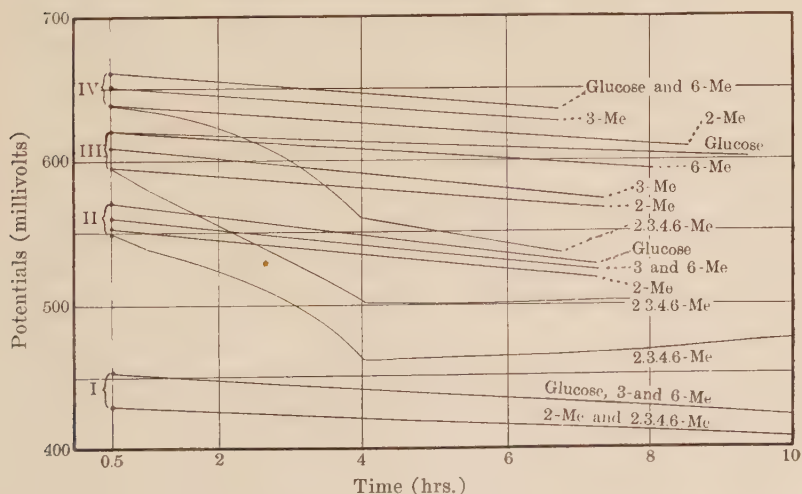
Suger	Quantity of sugar used (mg.)	Formaldehyde formed (mg.)
Glucose	27.3	4.15
2-Monomethyl glucose	30.0	3.77
3-Monomethyl glucose	30.0	2.36
2,3-Dimethyl glucose	35.0	1.54
2,3,4-Trimethyl glucose	35.0	0.21
6-Monomethyl glucose	35.0	0
n-Tetramethyl glucose	35.0	0

Quasi-Equilibrium-Potentials of Methylated Sugars.

On the basis of Wurmser's finding of redoxsystems in alkaline sugar solutions, Hirade (1934) examined the reduction potentials of sugars and related substances at various alkalinities and found that with a platinized electrode formaldehyde, aldopentoses, -hexoses, reducing disaccharides and glucosamine showed quasi-equilibrium-potentials of the same order. This was explained by him on the assumption of the possible formation of active formaldehyde from 1,2-di-enols of the aldoses. We determined the quasi-equilibrium-potentials of pure crystalline methylated sugars. Equal volumes of 0.1 M methylated sugar solutions and buffer solutions were mixed, and the potentials which developed against the platinized electrode in the atmosphere of oxygen-free nitrogen were measured potentiometrically at 38°C., a saturated KCl-calomel electrode being used as the reference electrode. The alkalinities of the solutions were pH 7.83 (phosphate buffer), pH 9.43 (carbonate-bicarbonate), pH 10.26 (carbonate-bicarbonate) and pH 11.6 (carbonate). The results are represented diagrammatically in Fig. 3. There was a tendency that the potentials of the

methylated sugars were slightly lower than that of unsubstituted glucose. At pH 7.83 this difference did not yet fully develop. 3- and 6-monomethyl glucose showed the potentials of the same order as that of free glucose, and the potentials of 2-monomethyl glucose and *n*-tetramethyl glucose which were most difficult to enolize, were about 20 millivolts lower than that of free glucose. At higher alkalinities the potentials of glucose, 3- and 6-monomethyl glucose were inclined to diverge; the potentials of glucose were the highest, then 6- and 3-monomethyl glucose in the order named. The order was never disturbed at any experiment. However, the difference in potentials of these sugars was not far beyond the experimental errors (± 10 millivolts). *n*-Tetramethyl glucose behaved quite exceptionally at higher alkalinities. Its potentials were almost the same as those of 2-monomethyl glucose at the initial periods but later they fell rapidly and reached new levels which were approximately 90–100 millivolts lower than the initial values. Taken in conjunction with the fact shown in Fig. 1 and 2 that the reduction of ferricyanide with *n*-tetramethyl glucose is paralyzed pretty soon, the difficulty with which *n*-tetramethyl

Fig. 3. Quasi-equilibrium-potentials of methylated sugars.



I pH 7.83, II pH 9.43, III pH 10.26, IV pH 11.6.

glucose enolizes may probably have some bearing upon the exceptional behavior of this sugar with respect to the quasi-equilibrium-potential.

Decomposition of Methylated Sugars with Enzymes.

Irvine and Hogg (1914) observed that yeast and a large number of bacilli were without action on 3-monomethyl glucose. So far as we examined, none of the methylated sugars were attacked either by yeast or by muscle, tumour or erythrocytes of various animals.

SUMMARY.

1. The reducing capacities of methylated glucoses (2-monomethyl, 3-monomethyl, 6-monomethyl, 2,3-dimethyl, 2,3,4-trimethyl, 3,5,6-trimethyl, 2,3,5,6-tetramethyl, 2,3,4,5-tetramethyl and 2,3,4,5,6-pentamethyl glucose) were determined by the procedures of Hanes, Somogyi, and Jonesco-Matinet and Vitner. Sobotka's observation with reference to the relation between reducing power and the position or number of methyl groups was confirmed for the most part.

2. The finer influence of the position and number of methyl groups on the facility of enolization and thus oxidation of the methylated glucoses was examined under milder conditions than those of the ordinary procedures of sugar determination. It was demonstrated with the Hanes procedure at 70°C. and with the potentiometric determination in the medium of alkaline ferricyanide, that the oxidation of 3-monomethyl glucose and 3,5,6-trimethyl glucose, took place with higher initial velocities but later the velocities diminished more rapidly than those in the case of the oxidation of unsubstituted glucose. In comparing the velocities of oxidation of 2,3,4,6-tetramethyl glucose and 2-monomethyl glucose a similar relation was observed.

3. 3-Monomethyl glucose decolorized methylene blue in Thunberg's tube with considerably greater velocity than free glucose.

4. The Lobry de Bruyn-van Ekenstein transformation

of 3-monomethyl glucose took place more easily than that of unsubstituted glucose. In the transformation of 2-monomethyl glucose, interconversion of glucose to mannose only took place, no ketose being formed.

5. The production of formaldehyde from methylated sugars was examined by oxidizing with periodic acid. The yield of formaldehyde seemed to decrease with the proximity of methyl group to C₆ and with the increase of the number of the groups.

6. The quasi-equilibrium-potentials of methylated sugars were observed. The potential of *n*-tetramethyl glucose showed a rapid fall of about 100 millivolts in alkaline medium.

REFERENCES.

- Anderson, C. G., Charlton, W. and Haworth, W. N. (1929): J. Chem. Soc., **132**, 1329.
Brigl, P. and Schinle, R. (1930): Ber. deutsch. chem. Ges., **63**, 2884.
Criege, R. (1932): Ann. Chem., **495**, 211.
Euler, H., Karrer, P. and Becker, B. (1936): Helv., **19**, 1060.
Fleury, P. and Lange, J. (1932): C. r. Acad. Sci., **195**, 1395.
Fleury, P. and Lange, J. (1933): J. Pharm. Chim., **17**, 409.
Greene, R. D. and Lewis, W. L. (1928): J. Amer. Chem. Soc., **50**, 2813.
Gross, C. E. and Lewis, W. L. (1931): J. Amer. Chem. Soc., **53**, 2772.
Gustus, E. L. and Lewis, W. L. (1927): J. Amer. Chem. Soc., **49**, 1512.
Hanes, C. S. (1929): Biochem. J., **23**, 99.
Haworth, W. N. and Leitch, G. C. (1918): J. Chem. Soc., **113**, 194.
Hirade, J. (1934): J. Biochem., **20**, 161.
Irvine, J. C. and Hogg, T. P. (1914): J. Chem. Soc., **105**, 1386.
Irvine, J. C. and Scott, J. P. (1913): J. Chem. Soc., **103**, 575.
Jonesco-Matinet, M. A. and Vitner, M. (1930): Bull. Soc. chim. biol., **12**, 1414.
Karrer, P. and Pfaehler, K. (1934): Helv., **17**, 766.
Levene, P. A. and Meyer, G. M. (1924): J. Biol. Chem., **60**, 173.
Levene, P. A. and Meyer, G. M. (1926): J. Biol. Chem., **69**, 175.
Levene, P. A. and Raymond, A. L. (1932): J. Biol. Chem., **97**, 751.
Malaprade, L. (1928): C. r. Acad. Sci., **186**, 382.
Ohle, H. and Vargha, L. (1929): Ber. deutsch. chem. Ges., **62**, 2435.
Purdie, T. and Bridgett, R. C. (1903): J. Chem. Soc., **83**, 1037.
Purdie, T. and Irvine, J. C. (1904): J. Chem. Soc., **85**, 1049.
Sobotka, H. (1926): J. Biol. Chem., **69**, 267.
Somogyi, M. (1926): J. Biol. Chem., **70**, 599.
Streptkov, S. M. (1936): Biochem. Z., **287**, 33.
Wolfrom, M. L. and Lewis, W. L. (1928): J. Amer. Chem. Soc., **50**, 837.

ÜBER DIE DERIVATE DER AMINOXYPROPÄN-SULFONSÄURE.

Beiträge zur Kenntnis der Biuretreaction von
M. Tomita und Mitarbeitern.

VON

SHIGERU TSUNOO.

(Aus dem physiolog.-chemischen Institut der medizinischen Fakultät
zu Nagasaki. Direktor: Prof. S. Utzino.)

(Eingegangen am 3. Februar 1937)

In der vorigen Mitteilung (1935) stellte ich 1-Chlor-2-oxypropansulfonsäure und daraus durch Ammoniak die dem Taurin strukturell sehr ähnliche Aminoxypropansulfonsäure dar. Man liess primäre und sekundäre Amine auf die Chlorverbindung einwirken und bekam die entsprechenden Salze, die die Biuretreaction geben. Bei der Kondensation der Chlorverbindung mit Trimethylamin wurde das Sulfonsäurebetain erhalten, welches weder Biuret- noch Ninhydrinreaktion zeigt. Ähnliche Verbindungen wurden auch bei Einwirkung von Chloroxypropansulfonsäure auf Pyridin, Chinolin und Isochinolin dargestellt.

Diesmal liess ich zunächst Toluidine, Xylidin, Chinaldin und Naphthylamin auf die Chloroxypropansulfonsäure einwirken. Bei der Kondensation der Chloroxypropansulfonsäure mit Äthylamin, Diäthylamin, Propylamin und Butylamin bekam ich die entsprechenden Salze, welche alle schöne Biuretreaction zeigten. Weiter habe ich das Verhalten der 1-Amino-2-oxypropansulfonsäure gegen Cyanamid geprüft. Die erhaltene Guanidinverbindung, welche keine Ninhydrin-, wohl aber schöne Biuretreaction zeigt, steht zu Asterubin von Ackermann (1935) strukturell in sehr enger Beziehung.

Eine Biuretreaction zeigende Verbindung muss nach Schiff (1898) im Molekül mindestens 2 Gruppen, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CSNH}_2$, $-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$, zum Teil auch $-\text{CH}-\text{NH}_2$ in offener Kette, nicht in

ringförmiger Bindung, enthalten und diese Gruppen dürfen unter sich durch nicht mehr als ein Atom Kohlenstoff oder Stickstoff vereinigt sein.

Beim Versuch der Synthese von γ -Amino- β -oxybuttersäure fand Prof. T. Tomita (1931), dass diese Aminoöxysäure mit Lauge und Kupfersulfat Biuretreaktion gibt. Durch weitere Untersuchungen war er imstande, ausser der Schiffsschen Regel als Gesetzmässigkeit abzuleiten, dass diejenigen Verbindungen reaktionsfähig sind, welche im Molekül mindestens einen endständig oder mittelständig liegenden Amino-oxy-äthylenrest $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{NH}_2$ besitzen.

Durch meine Untersuchungen konnte ich also Ergänzung seiner Experimente der Biuretreaktion daraufhin klarstellen, dass zu einem positiven Ausfall der Biuret- und Ninhydrinreaktion die Freiheit der Aminogruppe von Amino-oxy-äthylen-resten nicht absolut notwendig ist. Die Verbindungen, die im Moleküle einen Amino-oxy-äthylenrest besitzen, zeigen beide Reaktionen, wenn ein Wasserstoffatom der Aminogruppe auch durch einen Alkylrest ersetzt wird. Wenn zwei derselben durch zwei Alkylreste substituiert sind, geben die Verbindungen keine Ninhydrin-, wohl aber Biuretreaktion. Bei den Betainformen treten beide Reaktionen nicht mehr auf. Bei der Säureamidverkettung sowie bei der Einführung von Benzolkern sind beide Reaktionen negativ, während die Cyanamidverbindung dagegen noch Biuretreaktion zeigt.

Um das Verhalten der optischen Aktivität der Aminoöxypropansulfonsäure bei der substituierten Aminogruppe zu untersuchen, habe ich zunächst aktive Aminosäure durch Ammoniakwirkung auf aktive Choloroxypropansulfonsäure dargestellt, und zwar aus *d*-Chlorverbindung *l*-Aminosäure und aus *l*-Chlorverbindung *d*-Aminosäure. Es interessiert dabei, dass die Aminosulfonsäure desto mehr dreht, je mehr die Aminogruppe an CH_3 -Rest enthält. Hier sei noch erwähnt, dass wenn die Aminogruppe aber erschöpfend methyliert wird, nämlich bei der fünfwertigen Stickstoffbildung im Moleküle, die optische Aktivität wieder abnimmt.

Unter Berücksichtigung des Kuppelungs- sowie des Spaltungs- vermögens des Tierorganismus, z. B. Acylierung, Methylierung oder Entmethylierung habe ich einige Versuche mit Aminoxy- propansulfonsäure und ihrem Monomethyl- oder Pyridylderviat angestellt. Nach Verabreichung dieser Säuren wurden aber nur die unveränderten Körper im Harn wiedergefunden.

EXPERIMENTELLER THEIL.

I. Darstellung der Derivate der Aminoxypropansulfonsäure.

1-o-Toluidino-2-oxypropansulfonsäure: 7,0 g freie Chloroxy- propansulfonsäure wurden mit 38 g *o*-Toluidin in geschlossenem Rohr 10 Stdn. bei 100° erhitzt. Der Rohrinhalt wurde zu dickem Sirup eingengt, dann im Eisschrank zur Krystallisation stehen gelassen. Die Krystalle in der sirupösen Masse wurden zur Trennung vom beigemengten Sirup auf Ton ausgestrichen. Die Krystalle wurden in absolutem Alkohol heiss gelöst und durch Tierkohle entfärbt. Aus der eingengten Alkohollösung wurde die Substanz mit Äther gefällt. Der Niederschlag wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Es schieden sich aus Wasser mikroskopische Tafeln aus, die weder Biuret- noch Nin- hydrinreaktion zeigten.

0,0496 g Sbst.: 0,0881 g CO₂, 0,0282 g H₂O.

0,2290 g Sbst.: 8,5 ccm N/10-H₂SO₄.

C₁₀H₁₃NSO₄ Ber. C 48,94, H 6,17, N 5,75.

Gef. 48,43, 6,36, 5,20.

Die Säure reagiert sauer. Sie ist in Wasser löslich, in anderen organischen Solvenzien aber nicht. Der Schmp. liegt bei 235° (unkorr.). Mit Eisenchloridlösung zeigt sie eine bräunliche Färbung.

1-m-Toluidino-2-oxypropansulfonsäure: 7,0 g Chlorkörper wurden mit 50 g *m*-Toluidin im Rohr 25 Stdn. im Wasserbade erhitzt. Der Rohrinhalt wurde zur Krystallisation eingengt. Die im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz, die zur Trennung von der Mutterlauge auf Ton ausgestrichen wurde, wurde aus heissem Alkohol unter Zusatz von Tierkohle umkrystal-

liert. Dann schieden sich die Krystalle aus dem heissen Wasser aus und schmelzen bei 195° (unkorr.).

0,0482 g Sbst.:	0,0861 g CO ₂ ,	0,0268 g H ₂ O.
0,2044 g Sbst.:	9 ccm <i>n</i> /10-H ₂ SO ₄ .	
C ₁₀ H ₁₅ NSO ₄	Ber. C 48,94, H 6,17, N 5,75.	
	Gef. 48,71, 6,22, 6,16.	

Sie ist in Wasser löslich und reagiert sauer. Sie löst sich aber in Alkohol schwer, in anderen organischen Solvenzien nicht. Die Säure zeigt weder Biuret- noch Ninhydrinreaktion, aber mit Eisenchloridlösung eine bräunliche Färbung.

1-p-Toluidino-2 oxypropansulfonsäure: 7,0 g Chlorkörper, in 25 ccm Wasser gelöst, liess man mit 40-g *p*-Toluidin in 100 ccm absolutem Alkohol im Wasserbade 2 Tage lang zusammenwirken. Das Reaktionsgemisch wurde im Eisschrank zur Krystallisation stehen gelassen. Um das unveränderte Toluidin zu beseitigen, wurde die auskrystallisierte Masse mit Äther dann mit heissem Alkohol digeriert. Die Säure schied sich aus dem Wasser in mikroskopischen Tafeln aus und schmilzt bei 247° (unkorr.).

0,0494 g Sbst.:	0,0883 g CO ₂ ,	0,0275 g H ₂ O.
0,1580 g Sbst.:	6,0 ccm <i>n</i> /10-H ₂ SO ₄ .	
C ₁₀ H ₁₅ NSO ₄	Ber. C 48,94, H 6,17, N 5,75.	
	Gef. 48,74, 6,22, 5,31.	

Die Säure, in Wasser gelöst, reagiert sauer. In organischen Solvenzien löst sie sich nicht. Sie zeigt weder Biuret- noch Ninhydrinreaktion. Mit Eisenchlorid färbt sich die Lösung hell bräunlich.

1-m-Xylidino-2-oxypropansulfonsäure: 7,0 g Chlorkörper wurden mit 50 g *m*-Xylidin im Rohr 40 Stdn. bei 100° erhitzt. Nachdem der Rohrinhalt zum Sirup eingengt wurde, digerierte man den Sirup mit Äther gründlich. Da man keine Krystallisation aus der eingengten wässrigen Lösung sehen konnte, so wurde die wässrige Lösung in Alkohol gelöst, dann die Substanz mit Äther ausgefällt. Dieser Prozess wurde zur Reinigung mehrmals wiederholt. Endlich bildete sich eine in kaltem Alkohol unlösliche Substanz, welche abgesaugt und mit Alkohol sowie Äther ausgewaschen wurde.

0,0501 g Sbst.: 0,0940 g CO₂, 0,0307 g H₂O.

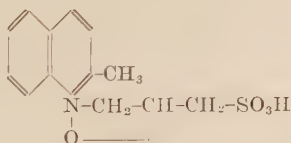
0,2406 g Sbst.: 8,8 ccm *n*/10-H₂SO₄.

C₁₁H₁₇NSO₄ Ber. C 50,92, H 6,61, N 5,40.

Gef. 51,16, 6,85, 5,12.

Die Substanz reagiert gegen Lackmus sauer. Sie ist in Wasser löslich, in heissem Alkohol schwer und in anderen organischen Solvenzien nicht. Der Schmp. liegt bei 213° (unkorr) unter Zersetzung. Biuret- und Ninhydrinreaktion fehlen. Mit Eisenchloridlösung zeigt sie beim Erhitzen eine Violettfärbung.

Einwirkung von Chinaldin auf Chloroxypropansulfonsäure: 7,0 g Chlorkörper wurden mit 20 g Chinaldin im Rohr 18 Stdn. im Wasserbade erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde zu Sirup eingeeengt, dann in Wasser gelöst und mit Äther behandelt. Die wässrige Lösung wurde auf dem Wasserbade zu Syrup eingeeengt, der mit wenig Alkohol, dann mit Äther umrührend versetzt und im Eisschrank stehen gelassen wurde, bis sich reichlich Krystalle ausschieden. Die getrocknete Krystallmasse wurde wiederholt in Alkohol gelöst und mit Äther ausgefällt, bis die Chloreaktion ausblieb. Die Substanz ist hygroskopisch und schmeckt bitter. Biuret- und Ninhydrinreaktion fehlen. Die wässrige Lösung ist gegen Lackmus sauer, während die durch Einwirkung von Chinolin auf den Chlorkörper gewonnene 1-Chinoly-2-oxy-propansulfosäurebetain neutral ist. Die Vermutung, dass es sich bei dieser Substanz wahrscheinlich um die folgende Konstitution handelt, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.



0,2136 g: 7,0 ccm *n*/10-H₂SO₄.

C₁₃H₁₅NSO₄ Ber. N 4,98, Gef. 6 4,59.

Die Säure löst sich in Wasser sehr leicht, in heissem Alkohol wohl, aber in Äther nicht.

Einwirkung von α-Naphthylamin auf Chloroxypropansulfonsäure: 7,0 g Chlorkörper liess man mit 25 g α-Naphthylamin in

70 cem Alkohol 78 Stdn. bei 100° zusammenwirken. Die krystallinische Masse wurde in Alkohol gelöst und mit Äther ausgefällt. Die gefällte Krystallmasse wurde aus Wasser 2 mal umkrystallisiert. So schied sich die Säure als büschelförmig gruppierte Krystalle aus, die sich etwas violett färbten und bei 165–170° schmolzen.

0,2370 g Subst.: 7,1 cem $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$.

$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NSO}_4$ Ber. N 4,98, Gef. N 4,24.

Die Verbindung, welche sauer reagiert, ist in heissem Wasser und Alkohol leicht löslich, aber in Äther nicht. Biuret- und Ninhydrinreaktion fehlen.

1-Monoäthylamino-2-oxypropansulfonsäure: 6,0 g Bleisalz der Chloroxypropansulfonsäure wurden mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die eingeeengte sirupöse Säure mit 8,3 g Äthylamin (in wässriger Lösung) im Rohr 10 Stdn. auf 100° erhitzt. Der Rohrinhalt wurde auf dem Wasserbade so lange erhitzt, bis das freie Äthylamin entfernt war. Zuletzt wurde die sirupöse Flüssigkeit in Wasser gelöst und mit Barytwasser versetzt, bis kein Äthylamingeruch mehr zu bemerken war. Nach genauem Ausfällen des Baryts mit verd. Schwefelsäure wurde das Filtrat unter vermindertem Druck zu einem dicken Sirup eingeeengt. Beim Stehenlassen im Eisschrank schieden sich feine Krystalle aus, welche mit absolut. Alkohol digeriert, mit Äther ausgewaschen und im Vakuum-Exsikkator über Schwefelsäure bis zu konstantem Gewicht getrocknet wurden.

0,2844 g Subst.: 14,7 cem $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$.

$\text{C}_5\text{H}_{13}\text{NSO}_4$ Ber. N 7,65, Gef. N 7,24.

Die Säure löst sich leicht in Wasser, dagegen nicht in kaltem Alkohol und Äther. Sie reagiert gegen Lackmus sauer. Wie erwartet, gibt sie eine Biuret- und Ninhydrinreaktion. Sie hat einen sauren Geschmack.

1-Diäthylamino-2-oxypropansulfonsäure: 7 g freier Chlorkörper wurden mit 25 g Diäthylamin im geschlossenen Rohr 10 Stdn. auf 100° erhitzt. Die durch Abdampfen und durch Barytzusatz vom Diäthylamin befreite Flüssigkeit wurde vom Baryt durch Schwefelsäure befreit und mit Ag_2CO_3 überschüssig

versetzt, und das Filtrat mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus dem stark eingeeengten Filtrat schied sich die Säure nach mehreren Monaten im Eisschrank als krystallinische Masse aus, welche nach dem Absaugen mit Alkohol und Äther ausgewaschen wurde.

0,0802 g Sbst.: 18,6 ccm $n/50\text{-H}_2\text{SO}_4$.

$\text{C}_7\text{H}_{17}\text{NSO}_4$ Ber. N 6,63, Gef. N 6,49.

Die Säure ist leicht löslich in Wasser, dagegen nicht in kaltem Alkohol und Äther. Sie reagiert gegen Lackmus sauer und schmeckt sauer. Biuretreaktion ist positiv, aber Ninhydrinreaktion negativ, was eben bei Dimethylaminooxypropansulfonsäure gesehen wurde.

1-Monopropylamino-2-oxypropansulfonsäure: 6 g Chloroxypropansulfonsäure wurden mit 20 g Propylamin im Rohr 10 Stdn. auf 100° erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde durch Baryt von überschüssigem Amin befreit, durch Schwefelsäure von Baryt befreit und mit überschüssigem Ag_2CO_3 versetzt. Aus dem mit SH_2 zerlegten Filtrat wurde eine krystallinische Masse ausgeschieden, die sehr hygroskopisch ist, daher im Vakuum über Schwefelsäure bis zu konstantem Gewicht getrocknet wurde.

0,5430 g Sbst.: 25,2 ccm $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$.

$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NSO}_4$ Ber. N 7,09, Gef. N 6,50.

Die sauer reagierende Substanz löst sich sehr leicht in Wasser, dagegen weder in Alkohol noch in Äther. Die Ninhydrin- und Biuretreaktion sind positiv.

1-Monoallylamino-2-oxypropansulfonsäure: 3 g Chlorkörper wurden mit 10 g Monoallylamin im Rohr 16 Stdn. auf 100° erhitzt. Der Rohrinhalt wurde in der angegebenen Weise von überschüssigem Amin sowie von befreitem Chlorion getrennt. Die vom Schwefelsilber abfiltrierte Lösung wurde im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure bis zu konstantem Gewicht getrocknet und analysiert, da es mir nicht gelang, eine krystallinische Substanz zu gewinnen.

0,1755 g Sbst.: 7,7 ccm $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$.

$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NSO}_4$ Ber. N 7,17, Gef. N 6,14.

Die sauer reagierende Substanz löst sich sehr leicht in Wasser, dagegen nicht in Alkohol und Äther. Biuret- und Ninhydrinreak-

tion sind positiv.

1-Monobutylamino-2-oxypropansulfonsäure: 5 g Chlorkörper wurden mit 20 g *n*-Butylamin im Rohr 37 Stdn. auf 100° erhitzt. Nachdem Amingeruch sowie Chlorion entfernt wurden, gelang es mir aus dem eingeeengten Sirup eine Krystallmasse von hygroskopischer Beschaffenheit zu erhalten.

0,2755 g Subst. (getr. im Vak. über Schwefelsäure.):

12,1 ccm *n*/10-H₂SO₄.

C₇H₁₇NSO₄ Ber. N 6,63, Gef. N 6,15.

Die Substanz löst sich sehr leicht in Wasser, reagiert gegen Lackmus sauer. Biuret- und Ninhydrinreaktion positiv.

Einwirkung von Cyanamid auf 1-Amino-2-oxypropansulfonsäure: 5,0 g Aminoxypropansulfonsäure in 80 ccm Wasser wurden mit 5,5 g Cyanamid versetzt und durch Ammoniakzusatz alkalisch gemacht, dann im Eisschrank zur Krystallisation stehen gelassen. Die nach mehreren Monaten ausgeschiedenen Krystalle wurden abgesaugt und mit absolutem Alkohol ausgewaschen. Die aus dem Wasser umkrystallisierte Substanz zeigt sich in mikroskopischen Tafeln, die gegen Lackmus neutral und in heissem Wasser leicht löslich sind, aber nicht in Alkohol und Äther.

0,0529 g Subst.: 0,0476 g CO₂, 0,0268 g H₂O.

C₄H₁₁N₃SO₄ Ber. C 24,40, H 5,62.

Gef. 24,53, 5,67.

Sie schmelzen bei 225° unter Aufschäumen. Sie zeigten keine Ninhydrinreaktion, wohl aber schöne Biuretreaktion.

[β-Naphthalinsulfonyl-methylamino]-oxypropansulfonsäures Natrium: 1 g Monomethylaminoxypropansulfonsäure wurde in 10 ccm Wasser gelöst, mit 6 ccm *n*-Natronlauge versetzt, dann wurden 3 g β-Naphthalinsulfochlorid in 25 ccm Äther gelöst, hinzugefügt und 2 Stdn. geschüttelt. Dazu wurden wieder 6 ccm *n*-Natronlauge hinzugegeben und weiter 2 Stdn. geschüttelt und schliesslich wurde das Gemisch unter weiterem Zusatz von 6 ccm Normalalkali nochmals 2 Stdn. geschüttelt. Nach Stehenlassen im Eisschrank wurde das ausgeschiedene Produkt abgesaugt und mit Äther gut ausgewaschen. Aus dem Wasser 2 mal umkrystallisiert, schied sich das Natriumsalz in glänzenden Tafeln aus. Ausbeute

fast quantitativ. Es schmilzt unter 280° nicht.

0,0504 g Sbst.: 0,0819 g CO_2 , 0,0216 g H_2O .

0,1506 g Sbst.: 4,0 ccm $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$.

$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NS}_2\text{O}_6\text{Na}$ Ber. C 44,06, H 4,23, N 3,67.

Gef. 44,31, 4,79, 3,71.

[*p*-Toluolsulfonylamino]-oxypropansulfonsaures Natrium: 3 g Aminooxypropansulfonsäure wurden in 20 ccm Wasser gelöst, mit 20 ccm *n*-Natronlauge versetzt, 5,7 g Toluolsulfochlorid in 50 ccm Äther gelöst, hinzugefügt und 2 Stdn. geschüttelt. Dann wurden wieder 20 ccm *n*-Natronlauge hinzugegeben und weiter 2 Stdn. geschüttelt. Diese Prozedur wurde nochmals wiederholt. Nachdem das Reaktionsgemisch mit Äther digeriert wurde, hat man die wässrige Schicht mit 12 ccm 5 *n*-Salzsäure versetzt und unter vermindertem Druck eingengt. Die ausgeschiedene Kristallmasse wurde aus wenig Wasser umkristallisiert. Weiter aus dem Wasser 3 mal umkristallisiert, schied sich das Natriumsalz in glänzenden Schüppchen aus, die bei 260° unter Aufschäumen sich zersetzen.

0,1628 g Sbst.: 4,7 ccm $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$.

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NS}_2\text{O}_6\text{Na}$ Ber. N 4,23, Gef. N 4,04.

[*p*-Toluolsulfonyl-monomethylamino]-oxypropansulfonsaures Natrium: 1 g Monomethylaminooxypropansulfonsäure wurde in 100 ccm Wasser gelöst, mit 6 ccm *n*-Natronlauge versetzt, 1,65 g *p*-Toluolsulfochlorid in 30 ccm Äther gelöst, hinzugefügt und 2 Stdn. geschüttelt. Dann wurde die Lösung unter Zusatz von 6 ccm *n*-Natronlauge 2 Stdn. geschüttelt. Die Schüttelung wurde unter Alkalizusatz nochmals wiederholt. Das ausgeschiedene Produkt wurde abgesaugt und mit Äther gut ausgewaschen. Die Mutterlauge wurde mit 5 *n*-Salzsäure versetzt und eingengt, um die Substanz weiter zu gewinnen. Ausbeute fast quantitativ. Aus dem Wasser 2 mal umkristallisiert, schied sich das Natriumsalz in konzentrisch gruppierten Nadeln oder Schüppchen aus, die unter 280° nicht schmelzen.

0,0512 g Sbst.: 0,0720 g CO_2 , 0,0242 g H_2O .

0,2076 g Sbst.: 6,1 ccm $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$.

$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NS}_2\text{O}_6\text{Na}$ Ber. C 38,23, H 4,67, N 4,06.

Gef. 38,34, 5,28, 4,11.

II. Darstellung der optisch aktiven Aminoxypropansulfonsäure und ihrer Derivate.

Chloroxypropansulfonsaures Brucin: 7,0 g freie, im verd. Alkohol gelöste Chloroxypropansulfonsäure werden mit 18,8 g Brucin in 50 ccm absolutem Alkohol gelöst. Beim Stehenlassen in Zimmertemperatur beginnt die Krystallisation des Brucinsalzes. Nach 1 Stunde wird die Krystallmasse abgenutscht und mit kaltem Alkohol 3 mal umkrystallisiert. Die Krystalle scheiden sich in Prismen aus. Der Schmp. liegt bei 232° (unkorr.).

0,0496 g Sbst.: 0,0993 g CO₂, 0,0271 g H₂O.

C₂₀H₃₃SO₃ClN₂ Ber. C 54,85, H 5,85.

Gef. 54,59, 6,11.

1-Benzoylamino-2-oxypropansulfonsaures Strychnin: 15 g Benzoylaminoxypropansulfonsäure werden in Wasser heiss gelöst mit 19,5 g käuflichem Strychnin in 90 proz. Alkohol auf dem Wasserbade unter Umrühren gelöst. Die ausgeschiedene Krystallmasse wird abgenutscht und vorsichtig mit Wasser und Äther ausgewaschen. Ausbeute 34,5 g. Schmp. 125° (unkorr.).

0,0480 g Sbst.: 0,1093 g CO₂, 0,0291 g H₂O.

C₃₁H₃₅N₃SO₄ Ber. C 62,86, H 5,95.

Gef. 62,09, 6,78.

Das Strychninsalz löst sich leicht in heissem Wasser und Alkohol, dagegen in Äther nicht.

Man wandte für die Synthese der optisch-aktiven 1-Chlor-2-oxy-propan-sulfonsäure und ihrer Derivate käufliches Strychnin an.

Chloroxypropansulfonsaures Strychnin: 35 g Chlorkörper werden in 750 ccm Wasser heiss gelöst und unter tüchtigem Umrühren mit 67 g käuflichem Strychnin versetzt. Beim Stehenlassen der klaren Lösung im Eisschrank scheidet sich das Strychninsalz der *l*-Verbindung in konzentrisch gruppierten Nadeln ab. Nach eintägigem Stehenlassen wird die Krystallmasse abgenutscht und mit kaltem Alkohol und Äther gewaschen. Die Krystallmasse wird nach A und die abgenutschte Flüssigkeit nach B behandelt.

(A) Um die Beimengung der isomeren Verbindung zu entfernen, habe ich die Krystallmasse aus Wasser umkrystallisiert.

Ausbeute 46 g. Schmp. liegt bei 104°–105° (unkorr.). (Strychninsalz A).

0,0502 g Stbst.: 0,1041 g CO₂, 0,0290 g H₂O.

C₂₄H₂₀N₂SO₆Cl Ber. C 56,72, H 5,76.

Gef. 56,55, 6,46.

(B) Die abgenutzte Lösung wird eingengt und im Eisschrank stehen gelassen. Daraus scheiden sich die Krystalle in makroskopischen, konzentrisch gruppierten Nadeln ab. Dieses Strychninsalz wird weiter umkrystallisiert, um die Beimengung der isomeren Verbindung zu entfernen. Ausbeute 45 g. Das im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Strychninsalz schmilzt bei 85° (Strychninsalz B.)

l-Chlor-2-oxypropansulfonsäure: 46 g Strychninsalz (A) werden in Wasser gelöst und die in Eis gekühlte Flüssigkeit mit 92 ccm *n*-Natronlauge versetzt. Das ausgeschiedene Strychnin wird nach eintägigem Stehenlassen im Eisschrank abgenutzt, dann nochmals mit Wasser gründlich gerührt und abgenutzt. Die wässrige Lösung wird mit 92 ccm *n*-Salzsäure umgerührt, unter vermindertem Druck bis zu Sirup verdampft und daraus liess sich der optisch aktive Chlorkörper mehrmals mit Alkohol isolieren. Der vereinigte Alkoholauszug wird mit Äther versetzt, der entstandene Niederschlag beseitigt und eingengt. Die sirupöse Flüssigkeit wird in Wasser aufgenommen und mit Bleicarbonat versetzt und abfiltriert, dann mit Äther geschüttelt. Die wässrige Lösung wird wieder eingengt und mit Alkohol-Äther gefällt. Das gefällte Bleisalz ist hygroskopisch und linksdrehend. Linksdrehend ist auch die freie Chloroxypropansulfonsäure, welche für die Synthese von *d*-Aminoxypropansulfonsäure und anderen *d*-Verbindungen angewandt wird.

d-1-Chlor-2-oxypropansulfonsäure: 45 g Strychninsalz (B) werden in Wasser gelöst, das Strychnin wird durch *n*-Natronlauge gefällt und der Chlorkörper genau so wie bei dem Antipoden isoliert. Das Bleisalz von *d*-Chloroxypropansulfonsäure ist auch rechtsdrehend. Für die Synthese der *l*-Reihe wandte ich die mit Schwefelwasserstoff zerlegte, freie rechtsdrehende Chloroxypropansulfonsäure an.

d-1-Amino-2-oxypropansulfonsäure: Die aus 46 g Strychninsalz befreite *l*-Chlorverbindung lässt man mit 50 g wässrigem Ammoniak (35 proz.) in Rohr bei Zimmertemperatur zusammenwirken. Nach einigen Tagen wird das überschüssige Ammoniak auf dem Wasserbade verjagt, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Bleioxyd gekocht, bis das Ammoniak verschwunden und die Lösung fast chlorfrei geworden ist. Das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff gefällt, die Mutterlauge unter vermindertem Druck eingeeengt und mit Alkohol gefällt. Die gefällte Krystallmasse wird aus dem Wasser umkrystallisiert. Die Krystalle werden im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Der Schmp. liegt bei 265° unter Zersetzung.

0,0513 g Sbst.: 0,0424 g CO₂, 0,0233 g H₂O.

0,1598 g Sbst.: 10,5 ccm *n*/10-H₂SO₄.

C₃H₉NSO₄ Ber. C 23,21, H 5,85, N 9,04

Gef. 22,51, 5,08, 9,20.

$[\alpha]_D^{15} = +0,25^\circ \times 25,1796/1,0 \times 1,012 \times 0,6814 = +9,13^\circ$ (in Wasser).

Die Säure löst sich leicht in Wasser, dagegen nicht in den meisten organischen Solvenzien. Sie reagiert gegen Lackmus sauer. Wie erwartet, gibt sie Biuret- und Ninhydrireaktion.

d-1-Monomethylamino-2-oxypropansulfonsäure: Die aus 25 g Strychninsalz durch Normalalkali befreite *l*-Chlorverbindung wurde mit 35 g Methylamin (33 proz.) versetzt und im Rohr 3 Stdn. auf 100° erhitzt. Der Rohrinhalt wurde durch Verdampfen und durch Aufkochen mit Bleioxyd vom Methylamin befreit. Nach der Zerlegung durch SH₂ wurde das Filtrat eingeeengt und mit Alkohol gefällt, der Niederschlag mit Alkohol und Äther ausgewaschen und aus wenig Wasser umkrystallisiert.

0,0497 g Sbst.: 0,0508 g CO₂, 0,0263 g H₂O.

0,1286 g Sbst.: 7,7 ccm *n*/10-H₂SO₄.

C₄H₁₁NSO₄ Ber. C 28,38, H 6,51, N 8,28.

Gef. 27,87, 5,92, 8,38.

$[\alpha]_D^{10} = +1,09^\circ \times 25,5976/1,0 \times 1,021 \times 1,3764 = +19,86^\circ$ (in Wasser).

Die Säure schmilzt bei 223° unter Zersetzung; sie reagiert gegen Lackmus sauer, schmeckt auch sauer und löst sich sehr leicht in Wasser, wenig in heissem Alkohol und bleibt unlöslich in anderen organischen Solvenzien. Ninhydrin- und Biuretreaktion

sind positiv.

d-1-Dimethylamino-2-oxypropansulfonsäure: Die aus 25 g Strychninsalz durch Normalalkali befreite *l*-Chlorverbindung wird mit 25 g Dimethylamin (33 proz.) im Rohr 3 Stdn. auf 100° erhitzt. Nachdem man das überschüssige Amin in der angegebenen Weise entfernt hatte, wurde das vom Blei durch Schwefelwasserstoff befreite Filtrat stark eingengt und mit Alkohol gefällt. Der Niederschlag wurde mit Alkohol und Äther ausgewaschen und aus Wasser umkrystallisiert.

0,0517 g Sbst.: 0,0620 g CO₂, 0,0335 g H₂O.

0,1748 g Sbst.: 9,5 ccm *n*/10-H₂SO₄.

C₅H₁₃NSO₄ Ber. C 32,71, H 7,11, N 7,65.

Gef. 32,70, 7,25, 7,61.

$[\alpha]_D^{15} = +2,43^\circ \times 25,5426 / 1,0 \times 1,025 \times 1,8947 = +31,96^\circ$ (in Wasser).

Die Säure schmilzt bei 251° unter Zersetzung. Die wässrige Lösung dieser Säure reagiert gegen Lackmus sauer und schmeckt süßsauer. Die Löslichkeit dieser Verbindung ist genau so wie die der *d*-Monomethylverbindung. Sie zeigt keine Ninhydrin-, wohl aber Biuretreaktion.

Einwirkung von Trimethylamin auf l-1-Chlor-2-oxypropansulfonsäure: Die aus 25 g Strychninsalz durch Normalalkali befreite *l*-Chlorverbindung wird mit 25 g Trimethylamin (33 proz.) im Rohr 3 Stdn. auf 100° erhitzt. Aus der durch Abdampfen auf dem Wasserbade vom Trimethylamin möglichst befreiten und stark eingengten Lösung wurde die Substanz mit absolutem Alkohol gefällt. Der schneeweiße Niederschlag wurde mit Alkohol und Äther ausgewaschen und dann aus Wasser umkrystallisiert. Er löst sich sehr leicht in Wasser mit neutraler Reaktion, dagegen in Alkohol und Äther nicht. Diese Substanz schmilzt nicht unter 295°. Ninhydrin- und Biuretreaktion sind negativ. Sie hat einen süßen Geschmack.

0,0495 g Sbst.: 0,0664 g CO₂, 0,0320 g H₂O.

0,1536 g Sbst.: 7,9 ccm *n*/10-H₂SO₄.

C₆H₁₅NSO₄ Ber. C 36,52, H 7,65, N 7,11.

Gef. 36,58, 7,23, 7,20.

$[\alpha]_D^{15} = +2,63^\circ \times 25,5734 / 1,0 \times 1,027 \times 2,2950 = +28,54^\circ$ (in Wasser).

d-1-n-Butylamino-2-oxypropansulfonsäure: Die aus 25 g

Strychninsalz durch Normalalkali befreite *l*-Chlorverbindung wurde mit 25 g Butylamin im Rohr 10 Stdn. auf 100° erhitzt. Nach Verjagen des zurückgebliebenen Amins wurde die Lösung stark eingeeengt. Daraus schieden sich die Krystalle in konzentrisch gruppierten Nadeln aus, die abgenutst und dann wieder aus heissem Alkohol umkrystallisiert wurden. Die durch kalten Alkohol und Äther gut ausgewaschenen und getrockneten Krystalle lösen sich sehr leicht in Wasser mit saurer Reaktion, in kaltem Alkohol und Äther dagegen nicht. Ninhydrin- und Biuretreaktion sind positiv.

0,2061 g Sbst.: 9 ccm *n*/10-H₂SO₄.

C₇H₁₇NSO₄ Ber. N 6,63, Gef. N 6,11.

$[\alpha]_D^{10} = +1,55^\circ \times 25,4168/1,0 \times 1,018 \times 1,7324 = +22,34^\circ$ (in Wasser).

l-1-Amino-2-oxypropansulfonsäure: Die aus 45 g Strychninsalz durch Normalalkali befreite *d*-Chlorverbindung wurde mit 50 g wässrigem Ammoniak (35 proz.) im Rohr bei Zimmertemperatur einige Tage lang stehen gelassen. Nach Verjagen des Ammoniaks durch Bleioxydzusatz wurde die Lösung mit Schwefelwasserstoff vom Blei befreit und unter vermindertem Druck eingeeengt dann mit Alkohol versetzt. Der gefällte Niederschlag wurde aus Wasser umkrystallisiert, mit Alkohol und Äther ausgewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Er schmilzt bei 265° unter Zersetzung.

0,0492 g Sbst.: 0,0425 g CO₂, 0,0250 g H₂O.

0,1625 g Sbst.: 10,5 ccm *n*/10-H₂SO₄.

C₃H₅NSO₄ Ber. C 23,21, H 5,85, N 9,04.

Gef. 23,55, 5,68, 9,05.

$[\alpha]_D^{10} = -0,37^\circ \times 25,3950/1,0 \times 1,016 \times 0,9562 = -9,67^\circ$ (in Wasser).

Die Säure löst sich leicht in Wasser, dagegen nicht in den meisten organischen Solvenzien. Sie reagiert gegen Lackmus sauer. Wie erwartet, gibt sie Biuret- und Ninhydrinreaktion.

l-1-Monomethylamino-2-oxypropansulfonsäure: Die aus 25 g Strychninsalz durch Normalalkali befreite *d*-Chlorverbindung wurde mit 25 g Methylamin (33 proz.) im Rohr 10 Stdn. erhitzt. Die *l*-Monomethylaminooxypropansulfonsäure wurde genau in derselben Weise wie beim Antipoden isoliert. Aus der mit Tierkohle entfärbten wässrigen Lösung schieden sich die Krystalle in kon-

zentrisch gruppierten Nadeln oder Tafeln aus, die abgesaugt, mit Alkohol und Äther ausgewaschen wurden. Die Säure schmilzt bei 225° unter Zersetzung; sie reagiert gegen Lackmus sauer, schmeckt sauer und löst sich sehr leicht in Wasser, dagegen nicht in anderen organischen Solvenzien. Ninhydrin- und Biuretreaktion sind positiv.

0,0504 g Sbst.: 0,0524 g CO₂, 0,0272 g H₂O.

0,0536 g Sbst.: 16,0 ccm *n*/50-H₂SO₄.

C₄H₁₁NSO₄ Ber. C 28,38, H 6,51, N 8,28.

Gef. 28,33, 6,03, 8,36.

$[\alpha]_D^{12} = -0,85^\circ \times 25,5532 / 1,0 \times 1,0193 \times 1,2350 = -17,25^\circ$ (in Wasser).

l-1-Dimethylamino-2-oxypropansulfonsäure: Die *l*-Dimethylaminoxypropansulfonsäure wurde genau in derselben Weise wie beim Antipoden dargestellt. Die Erhitzung des Reaktionsgemisches im Rohr dauerte aber 8 Stdn. lang. Sie schied sich aus Wasser in kleinen Prismen aus, die sehr leicht in Wasser löslich sind, dagegen nicht in anderen organischen Solvenzien. Die wässrige Lösung reagiert gegen Lackmus sauer und schmeckt süßsauer. Sie schmilzt bei 243° unter Zersetzung. Sie zeigt keine Ninhydrin-, wohl aber Biuretreaktion.

0,0539 g Sbst.: 14,7 ccm *n*/50-H₂SO₄.

C₆H₁₃NSO₄ Ber. N 7,65, Gef. N 7,64.

$[\alpha]_D^{30} = -2,25^\circ \times 25,4903 / 1,0 \times 1,0252 \times 1,8973 = -29,49^\circ$ (in Wasser).

Einwirkung von Trimethylamin auf d-1-Chloroxy-propansulfonsäure: Die *l*-Verbindung wurde nach 8 stündigem Erhitzen im Rohr genau in der Weise wie beim Antipoden isoliert. Aus Wasser scheidet sie sich in grossen Tafeln aus, die bei 285° unter Zersetzung schmolzen. Ninhydrin- und Biuretreaktion sind negativ. Das Löslichkeitsverhalten ebenso wie bei der *d*-Verbindung.

0,0606 g Sbst.: 15,7 ccm *n*/50-H₂SO₄.

C₆H₁₅NSO₄ Ber. N 7,11, Gef. N 7,23.

$[\alpha]_D^{23} = -1,07^\circ \times 25,1429 / 1,0 \times 1,0118 \times 0,9988 = -26,63^\circ$ (in Wasser).

l-1-*n*-Butylamino-2-oxypropansulfonsäure: Die aus 15 g Strychninsalz durch Normalalkali befreite *d*-Chlorverbindung wird mit 20 g Butylaminlösung im Rohr 8 Stdn. auf 100° erhitzt. Die Isolierung der *l*-Butylaminverbindung geschah in der Weise wie

beim Antipoden. Die Substanz wurde aus heissem Alkohol in Nadeln erhalten. Die mit Alkohol und Äther ausgewaschene Kristallmasse löst sich sehr leicht in Wasser, dagegen nicht in kaltem Alkohol und Äther. Ninhydrin- und Biuretreaktion sind positiv.

0,0534 g Sbst.: 11,0 ccm $n/50\text{-H}_2\text{SO}_4$.

$\text{C}_7\text{H}_{17}\text{NSO}_4$ Ber. N 6,63, Gef. N 5,76.

$[\alpha]_D^{30} = -0,50^\circ \times 25,0363/1,0 \times 1,0063 \times 0,5398 = -23,08^\circ$ (in Wasser).

III. Über das Verhalten von Aminoxypropansulfonsäure und ihren Derivaten im tierischen Organismus.

Um das Schicksal der Aminoxypropansulfonsäure und ihrer Derivate im tierischen Organismus zu studieren, habe ich zunächst Aminoxypropansulfonsäure in einmaliger Dosis von 5 g an Kaninchen innerlich verabreicht. Der in 24 Std. gewonnene Harn wurde, so frisch als möglich, mit β -Naphthalinsulfochlorid behandelt. Man bekam daraus 0,2 g reines β -naphthalinsulfonylaminoxypropansulfonsaures Natrium.

0,1367 g Sbst.: 3,2 ccm $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$.

$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{NS}_2\text{O}_6\text{Na}$ Ber. N 3,81, Gef. N 3,27.

Dieselben Versuche wurden wiederholt und im ganzen 15 g Aminosulfonsäure verabreicht. Daraus erhielt man 1,4 g Naphthalinsulfoverbindung. Wenn man 1 g Aminosulfonsäure intravenös injiziert, kann man aus 48 stündigem Harn 1,0 g Naphthalinsulfoverbindung erhalten.

Wenn man nun 3 g Monomethylaminoxypropansulfonsäure an Kaninchen innerlich verabreicht, so kann man aus 72 stündigem Harn 0,16 g reines β -naphthalinsulfonylmethylaminoxypropansulfonsaures Natrium gewinnen.

0,1565 g Sbst.: 3,5 ccm $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$.

$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NS}_2\text{O}_6\text{Na}$ Ber. N 3,67, Gef. N 3,13.

Um zu prüfen, ob die Pyridyloxypropansulfonsäure wie das Pyridin im Tierorganismus auch methyliert wird oder nicht, habe ich einerseits an Hunden 32 g Pyridyloxypropansulfonsäure, andererseits an Kaninchen 50 g derselben subcutan injiziert. Man konnte aus den beiden Harnen keine Spur von Methylverbindung isolieren. Nur aus dem Kaninchenharn wurden 2,0 g Pyridyloxy-

propansulfonsäurebetain wiedergefunden.

Einen aus 1-Amino-2-oxypropansulfonsäure mutmasslich veränderten methylierten Körper, wie Sulfonsäurebetain, im Harn aufzufinden, ist nicht gelungen.

Über die Funktionsprüfung der Leber mit dieser Aminoxypropansulfonsäure und über die Schwefelverteilung im Harn nach Fütterung mit derselben sind meine Untersuchungen noch im Gang.

Den Herren Prof. M. Tomita und Prof. S. Utzino spreche ich für ihre freundlichst erteilten Ratschläge bei Ausführung dieser Arbeit meinen verbindlichsten Dank aus.

LITERATUR.

Ackermann, D. (1935): Z. f. physiol. Chem., **232**, 206.
ebenda **234**, 208.

Schiff, H. (1898): Liebigs Ann., **299**, 236.

Tomita, M. (1931): Z. f. physiol. Chem., **201**, 38.

Tsunoo, S. (1934): Ber. d. deuts. chem. Ges., **68**, 1334.

